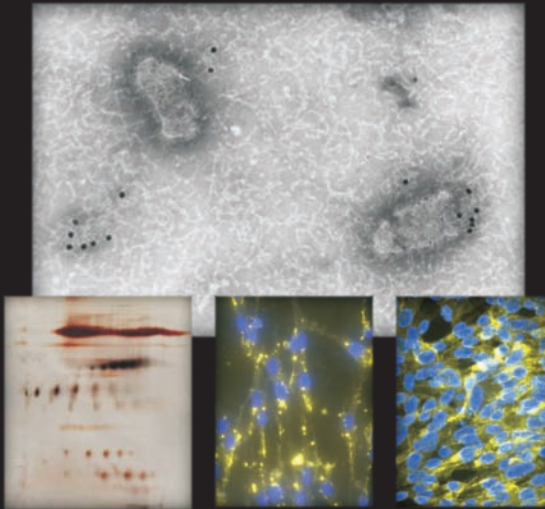


# CHARAKTERISIERUNG DER TOLLWUTVAKZINEN "RABIPUR" UND "RABIVAC" UND DER ENTHALTENEN VIRUSSTÄMME FLURYLEP UND PM 1503

**Claudia Carolina López Yomayua**



## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

**Charakterisierung der Tollwutvakzinen "Rabipur" und "Rabivac"  
und der enthaltenen Virusstämme  
FluryLEP und PM 1503**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von  
Claudia Carolina López Yomayusa  
Tierärztin aus Bogotá, Kolumbien

Giessen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
Der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der Disputation: 25.08.2009

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



*a mi hijo,*

*mi esposo,*

*mi familia*

*y*

*en memoria de*

*Abelardo y Salomé*





## INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	12
TABELLENVERZEICHNIS	14
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	15
1. EINLEITUNG	19
1.1 Literaturübersicht	19
1.1.1 Der Erreger	20
1.1.1a Taxonomie	20
1.1.1b Epidemiologie	21
1.1.1c Struktur und Morphologie des Erregers	25
1.1.1d Replikation	28
1.1.2 Pathogenese	31
1.1.2a Übertragung	31
1.1.2b Inkubationszeit	31
1.1.2c Virale Infektion und Ausbreitung	31
1.1.2d Pathologie	33
1.1.2e Immunologie	34
1.1.2ea Allgemeine Einführung	34
1.1.2eb Immunantwort gegen Tollwutvirus	36
1.1.2ec Zielproteine der antiviralen Immunantwort	37
1.1.2ed Die Immunantwort nach Impfung gegen Tollwut	39
1.1.3 Klinische Symptomatik	39
1.1.4 Diagnose	41
1.1.5 Therapie	43
1.1.6 Prophylaxe	43
1.1.6a Präexpositionelle Immunisierung	44
1.1.6b Postexpositionelle Prophylaxe (PEP)	44
1.1.7 Impfstoffe zur Anwendung beim Menschen	47
1.1.7a Qualitätskontrolle bei Impfstoffen	47
1.1.7b Nebenwirkungen	48
1.2 Zielsetzung der Arbeit	51
2. MATERIAL UND METHODEN	53
2.1 Material	53
2.1.1 Biologisches Material	53
2.1.1a Versuchstiere	53
2.1.1b Zellkulturen	53
2.1.1c Viren	54
2.1.2 Vakzinen	54

2.1.3 Medien und Platten	55
2.1.3a Medien für Zellkultur	55
2.1.3b Medien und Platten für die Kultivierung von Bakterien	57
2.1.4 Zusätze für Medien und Agarplatten	57
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	58
2.1.6 Puffer und Lösungen	59
2.1.6a Häufig verwendete Puffer	59
2.1.6b Puffer für RT-PCR	60
2.1.6c Puffer für Sequenzierung	61
2.1.6d Puffer für SDS-PAGE	62
2.1.6da Eindimensionale Gelelektrophorese (1-D SDS-PAGE)	62
2.1.6db Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D SDS-PAGE)	63
2.1.6e Puffer für Protein-Transfer auf Membran	64
2.1.6ea Semi-Dry Transfer	64
2.1.6eb Nasstransfer	64
2.1.6f Lösungen für Protein-Färbung	65
2.1.6fa Coomassie-Färbung	65
2.1.6fb Silberfärbung	65
2.1.6g Puffer für die Reinigung der rekombinanten Proteine	66
2.1.6h Puffer für Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Sephrose G	67
2.1.6i Puffer für die Reinigung der Antikörper	68
2.1.6j Puffer für die Biotinylierung von polyklonalen Antikörpern	68
2.1.6k Puffer für ELISA	68
2.1.7 Antikörper	69
2.1.8 Fertige Reagenzien und Kits	70
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	70
2.1.10 Geräte	71
2.2 Methoden	73
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	73
2.2.1a Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	73
2.2.1aa RNS Isolierung aus Kulturzellen	73
2.2.1ab Reverse Transkription	73
2.2.1ac Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	74
2.2.1b PCR-Analyse von Baculoviren	74
2.2.1ba DNS-Isolierung aus Virussuspensionen	74
2.2.1bb Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	75
2.2.1c Agarose-Gelelektrophorese	76
2.2.1d Herstellung rekombinanter Baculovirus-Transferplasmide	76
2.2.1e Mini-Präparation von Plasmid-DNS	78
2.2.1f Restriktionsenzym-Verdau	78
2.2.1g DNS-Sequenzierung	79

2.2.1h Auswertung von Sequenzen	79
2.2.2 Zellbiologische Methoden	80
2.2.2a Kultivierung von Insektenzellen (SF-21)	80
2.2.2b Kryokonservierung von Zellen	80
2.2.2c Trypsinieren von Zellen	81
2.2.2d Bestimmung der Zellzahl	81
2.2.2e Transfektion von Insektenzellen	81
2.2.2f Plaque-Test	84
2.2.2g Virusvermehrung	85
2.2.2ga Vermehrung von rekombinanten Baculoviren	85
2.2.2gb Vermehrung und Reinigung von Tollwutviren	85
2.2.2h Titration von Tollwutviren	86
2.2.3 Proteinanalytische Methoden	87
2.2.3a Proteinbestimmung	87
2.2.3b SDS-PAGE	87
2.2.3ba Eindimensionale Gelelektrophorese (1-D SDS-PAGE)	87
2.2.3bb Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D SDS-PAGE)	88
2.2.3c Färbung von Proteingelen	89
2.2.3ca Coomassie-Färbung	89
2.2.3cb Silberfärbung	89
2.2.3d Immunoblot	90
2.2.3e N-terminale Peptid-Sequenzierung	91
2.2.3f Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	91
2.2.4 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine	93
2.2.4a Expression des rekombinanten Glykoproteins (GP) und des Nukleoproteins (NP) von Tollwutvirus	93
2.2.4b Reinigung der rekombinanten Proteine	93
2.2.4ba Affinitäts-Chromatographie	93
2.2.4bb Elektroelution nach SDS-PAGE	96
2.2.5 Herstellung von polyklonalen Antikörpern	96
2.2.6 Fluorescent antibody virus neutralisation test - FAVN-Test	97
2.2.7 Etablierung eines ELISAs	98
2.2.7a Reinigung von IgG	99
2.2.7b Biotinylierung der polyklonalen Antikörper	99
2.2.7c Durchführung des ELISAs	100
2.2.7ca Vorbereitung der Proben	100
2.2.7cb Ablauf des ELISAs	101
2.2.7d Berechnung der Standardkurve	101
2.2.8 Mikroskopie	103
2.2.8a Immunfluoreszenz-Mikroskopie	103
2.2.8aa Direkte Immunfluoreszenz	103

2.2.8ab Indirekte Immunfluoreszenz	104
2.2.8b Immunelektronenmikroskopie	104
3. ERGEBNISSE	106
3.1 Charakterisierung der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503	106
3.1.1 Analysen auf der Basis von Nukleinsäuresequenzen	106
3.1.2 Analysen auf der Basis von Aminosäuresequenzen	108
3.2 Gewinnung und Charakterisierung von polyklonalen Seren	111
3.2.1 Herstellung von rekombinanten Baculoviren	111
3.2.2 Expression des Glyko-/Nukleoproteins der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503	114
3.2.3 Reinigung der rekombinanten Proteine	114
3.2.4 Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Seren	117
3.2.4a Reaktivität der Seren im Immunoblot	119
3.2.4b Reaktivität der Seren in der Immunfluoreszenz	120
3.2.4c Virusneutralisation mit Hilfe der anti-G-Seren	121
3.3 Etablierung eines ELISAs	122
3.3.1 Standardisierung des ELISAs	122
3.3.2 Qualitätsparameter des ELISAs	124
3.3.2a Nachweisempfindlichkeit	124
3.3.2b Reproduzierbarkeit des ELISAs	124
3.4 Biochemische Charakterisierung der Impfstoffe „Rabipur“ und „Rabivac“	127
3.4.1 Quantifizierung des Nukleo-/Glykoproteins in den Viruskonzentraten und in den Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“ mittels ELISA	127
3.4.2 Identifizierung von Nukleo-/Glykoprotein mittels Immunelektronenmikroskopie	129
3.4.3 Nachweis der Proteine in den Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“	132
3.4.3a Identifizierung viraler Proteine mittels Immunoblot	135
3.4.3b Identifizierung von Proteinen mittels N-terminaler Peptid-Sequenzierung	139
3.4.3c Identifizierung nicht viraler Proteine mittels Immunoblot	142
3.4.3d Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF MS	144
3.4.3e Zusammenfassung der Identifizierung von Proteinen in den Viruskonzentraten der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 sowie in den entsprechenden Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“	145
3.5 Gewinnung von Tollwutviruskonzentraten und deren Charakterisierung	148
3.5.1 Vermehrung von Tollwutviren	148
3.5.2 Reinigung von Tollwutviren	149

---

3.5.3	Charakterisierung der Tollwutviruskonzentrate FL <sup>-</sup> bzw. FL <sup>+</sup>	151
3.5.3a	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der FL <sup>-</sup> bzw. FL <sup>+</sup>	151
3.5.3b	Charakterisierung der FL <sup>-</sup> bzw. FL <sup>+</sup> mittels 2-D SDS-PAGE	151
4.	DISKUSSION	154
4.1	Molekulare Charakterisierung der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503	154
4.2	Biochemische Charakterisierung der Tollwutimpfstoffe „Rabipur“ und „Rabivac“	158
4.2.1	Integrität von Tollwutviruspartikeln	158
4.2.1a	Direkte Untersuchung der Integrität von Tollwutviruspartikeln	159
4.2.1b	Indirekte Untersuchung der Integrität von Tollwutviruspartikeln	159
4.2.2	Charakterisierung der Proteome von Vakzinen	164
4.2.2a	Identifizierung viraler Proteine	165
4.2.2b	Identifizierung nicht viraler Proteine	166
5.	ZUSAMMENFASSUNG	170
6.	SUMMARY	172
7.	RESUMEN	174
8.	LITERATURVERZEICHNIS	176

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1.1.</i> Verteilung der Tollwut.	24
<i>Abbildung 1.2.</i> Struktur und Morphologie von Tollwutvirus.	26
<i>Abbildung 1.3.</i> Replikationszyklus von Tollwutvirus.	30
<i>Abbildung 1.4.</i> Schematische Darstellung der Pathogenese von Tollwutvirus.	33
<i>Abbildung 1.5.</i> Schematischer Aufbau des Glykoproteins des Tollwutvirus.	38
<i>Abbildung 2.1.</i> Fließschema zur Herstellung der Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“.	56
<i>Abbildung 2.2.</i> Herstellung rekombinanter Baculoviren für die Expression von Proteinen.	83
<i>Abbildung 2.3.</i> Prinzip der analytischen Methode MALDI-TOF MS.	92
<i>Abbildung 2.4.</i> Immunisierungsschema zur Gewinnung polyklonaler Seren.	97
<i>Abbildung 2.5.</i> Schematische Darstellung des Sandwich ELISA Verfahrens.	102
<i>Abbildung 3.1.</i> Phylogenetische Bäume von Tollwutviren.	107
<i>Abbildung 3.2.</i> Vergleich der Aminosäuresequenzen des Nukleoproteins der Tollwutvirus-stämme FluryLEP (FL), FluryHEP (FH), PM 1503 (PM), CVS, PV und SAD-B19.	110
<i>Abbildung 3.3.</i> Vergleich der Aminosäuresequenzen des Glykoproteins der Tollwutvirusstämme FluryLEP (FL), FluryHEP (FH), PM 1503 (PM), CVS, PV und SAD-B19.	112
<i>Abbildung 3.4.</i> Identifizierung rekombinanter Baculoviren mittels PCR (A) und erwartete Größe der Insertionen (zuzüglich 525 Basenpaare (bp) aus dem Vektor) (B).	113
<i>Abbildung 3.5.</i> Mikroskopische Analyse infizierter Insektenzellen.	115
<i>Abbildung 3.6.</i> Reinigung des N-Proteins der Virusstämme FluryLEP (A) und PM 1503 (B) mittels Metallionen-Affinitäts- Chromatographie.	116
<i>Abbildung 3.7.</i> Reinigung des rekombinanten Tollwutvirusglykoproteins.	118
<i>Abbildung 3.8.</i> Einsatz der Seren gegen N und G im Immunoblot.	120

<i>Abbildung 3.9.</i> Reaktivität der polyklonalen Seren in der Immunfluoreszenz.	121
<i>Abbildung 3.10.</i> Darstellung einer Messkurve des Standards im ELISA für die Quantifizierung des Nukleoproteins (A) und des Glykoproteins (B) von Tollwutvirus.	123
<i>Abbildung 3.11.</i> Darstellung der Messkurven des Nukleoproteins von Tollwutvirus.	125
<i>Abbildung 3.12.</i> Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen von Virionen im Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes FluryLEP.	131
<i>Abbildung 3.13.</i> Silberfärbung von Viruskonzentraten der Tollwutvirustämme FluryLEP (1) und PM 1503 (3) und den entsprechenden Vakzinen „Rabipur“ (2) und „Rabivac“ (4).	134
<i>Abbildung 3.14.</i> Identifizierung des Tollwutvirusnukleoproteins im Viruskonzentrat (FluryLEP) (A) und in der entsprechenden Vakzine „Rabipur“ (B) im Immunoblot nach 2-D SDS-PAGE .	136
<i>Abbildung 3.15.</i> Identifizierung des Tollwutvirusglykoproteins im Viruskonzentrat (FluryLEP) im Immunoblot nach 2-D SDS-PAGE .	137
<i>Abbildung 3.16.</i> Identifizierung von Tollwutvirusmatrixprotein im Viruskonzentrat (PM 1503) (A) und in der entsprechenden Vakzine „Rabivac“ (B) im Immunoblot nach 2-D SDS-PAGE .	138
<i>Abbildung 3.17.</i> Identifizierung von Tollwutviruslargeprotein in den Viruskonzentraten.	140
<i>Abbildung 3.18.</i> Identifizierung von Proteinspots durch N-terminale Peptid-Sequenzierung.	141
<i>Abbildung 3.19.</i> Identifizierung nicht viraler Proteine im Immunoblot.	143
<i>Abbildung 3.20.</i> Selektion der Proteinspots zur Analyse mittels MALDI-TOF MS.	145
<i>Abbildung 3.21.</i> Reinigung von Tollwutviruspartikeln.	150
<i>Abbildung 3.22.</i> Elektronenmikroskopische Aufnahme der gereinigten Tollwutviruspartikel aus FL <sup>-</sup> (A) und FL <sup>+</sup> (B) nach Negativkontrastierung.	152
<i>Abbildung 3.23.</i> Silberfärbung der gereinigten Tollwutvirussuspensionen FL <sup>-</sup> (A) bzw. FL <sup>+</sup> (B) nach 2-D SDS-PAGE.	153

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1	<i>Einteilung von Lyssaviren.</i>	21
Tabelle 1.2	<i>Vektoren und geographische Verbreitung von Lyssaviren.</i>	22
Tabelle 1.3	<i>Charakteristika der Proteine von Lyssaviren.</i>	27
Tabelle 1.4	<i>Diagnose der Tollwut.</i>	42
Tabelle 1.5	<i>Präexpositionelle Tollwutimmunisierung</i>	45
Tabelle 1.6	<i>Grad der Tollwutexposition und empfohlene postexpositionelle Prophylaxe nach WHO.</i>	46
Tabelle 1.7	<i>Potenz-Test für inaktivierte Tollwutvakzinen: NIH-Test und seine Varianten (Bruckner et al., 2003).</i>	50
Tabelle 2.1	<i>Primersequenzen zur Amplifizierung der cDNS des Tollwutvirus G-Proteins.</i>	77
Tabelle 2.2	<i>Rekombinante Baculoviren.</i>	84
Tabelle 2.3	<i>Immunoblot Verfahren.</i>	90
Tabelle 2.4	<i>Affinitäts-Chromatographie Verfahren.</i>	95
Tabelle 3.1	<i>Genbank-Zugangsnummern von kompletten Genomsequenzen von Tollwutviren.</i>	106
Tabelle 3.2	<i>Homologie zwischen Tollwutviren der Spezies Rabies Virus.</i>	109
Tabelle 3.3	<i>Intra-Assay-Variation von N- und G-ELISA.</i>	126
Tabelle 3.4	<i>Inter-Assay-Variation von N- und G-ELISA.</i>	127
Tabelle 3.5	<i>Relative Konzentrationen des Nukleo- und des Glykoproteins in den Viruskonzentraten des Tollwutvirusstammes FluryLEP (Rabipur) und PM 1503 (Rabivac) und den entsprechenden Vakzinen nach Quantifizierung mittels ELISA.</i>	129
Tabelle 3.6	<i>Mittels MALDI-TOF MS Analysen identifizierte Proteine.</i>	146
Tabelle 3.7	<i>Identifizierte Proteine in den Viruskonzentraten der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 sowie in den entsprechenden Impfstoffen „Rabipur“ und „Rabivac“.</i>	147
Tabelle 3.8	<i>Relative Molekulargewichte und pI-Werte der identifizierten Tollwutvirusproteine.</i>	148
Tabelle 3.9	<i>Vermehrung von Tollwutviren in Zellkultur.</i>	149



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABDB	<i>"Antibody dilution buffer"</i>
ABLV	<i>"Australian Bat Lyssavirus"</i>
ABTS	2, 2-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]
AcMNPV	<i>"Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus"</i>
Ak	Antikörper
APCs	antigenpräsentierende Zellen
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>"American Tissue Culture Collection"</i>
Bac.	Baculovirus
BBB	<i>"Blood-Brain Barrier"</i>
BCA	<i>"bicinchoninic acid"</i>
BHK	<i>"Baby Hamster Kidney"</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	<i>"grad celsius"</i>
ca.	circa
CD	<i>"clusters of differentiation"</i>
CDC	<i>"Centers for Disease Control and Prevention"</i>
CVS	Challenge Virus Standard
dd	doppelt destilliert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythimidintriphosphat
DMEM	<i>"Dulbecco's modified Eagle Medium"</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

DUVV	Duvenhage Virus
EBLV	<i>"European Bat Lyssavirus"</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	<i>"Enzyme linked Immunosorbent Assay"</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERA	Evelyn Rokitniki Abelseth
Fa.	Firma
FAT	<i>"Fluorescent Antibody Test"</i>
FAVN-Test	<i>"Fluorescent Antibody Virus Neutralisation" Test</i>
FBS	Foetales bovines Serum
FluryHEP	<i>"High Egg Passage"</i> Flury Stamm
FluryLEP	<i>"Low Egg Passage"</i> Flury Stamm
FL <sup>-</sup>	Tollwutvirus des Virusstamms FluryLEP unter Einsatz von Kulturmedium ohne FBS
FL <sup>+</sup>	Tollwutvirus des Virusstamms FluryLEP unter Einsatz von Kulturmedium mit 10 % FBS
g	gramm
G	Glykoprotein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IU	<i>"International Units"</i>
kDa	Kilodalton
L	Liter
L	Largeprotein
LB	Luria Bertani
LBV	<i>"Lagos Bat Virus"</i>
LMP	<i>"Low Melting Point"</i>
M	Matrixprotein
mA	Milliampere
MALDI-TOF MS	<i>"Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation time-of-flight Mass Spectrometry"</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm

---

µm	Mikrometer
MHC	<i>"Major Histocompatibility Complex"</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>"Multiplicity Of Infection"</i>
MOKV	Mokola Virus
N	Nukleoprotein
n.a.	nicht applizierbar
n.s.	nicht spezifiziert
ng	Nanogramm
NIH-Test	<i>"National Institutes of Health" Test</i>
nm	Nanometer
o.a.	oben angegeben
OD	Optische Dichte
OIE	<i>"Office International des Epizooties"</i>
P	Phosphoprotein
p.i.	post-Infektion
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>"Phosphate Buffered Saline"</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	postexpositionelle Prophylaxe
pfu	<i>"Plaque Forming Unit"</i>
Ph.Eur.	<i>"European Pharmacopoeia"</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PM	Pitman-Moore
PV	Pasteur Virus
PVDF	polivinylidene fluorid
RABV	Rabies Virus
RFFIT-Test	<i>"Rapid Fluorescent Focus Inhibition" Test</i>
RNP	Ribonukleoprotein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>"revolutions per minute"</i>
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.o.	siehe oben
SAD	Street-Alabama-Dufferin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SF	Spodoptera frugiperda
SOC	SOB (" <i>super optimal broth</i> ")-Medium plus Glukose
s.u.	siehe unten
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TCID <sub>50</sub>	" <i>Tissue Culture Infectious Dose</i> " 50 %
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
u.a.	unter anderen
ü.N.	über Nacht
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. Chr.	vor Christus
VNA	virusneutralisierender Antikörper
v/v	" <i>volume per volume</i> "
WHO	" <i>World Health Organisation</i> "
w/v	" <i>weight per volume</i> "
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Literaturübersicht

Tollwut ist eine lebensbedrohliche Krankheit bei Säugetieren, die seit über drei Jahrtausenden bekannt ist. Die erste Erwähnung der Tollwut datiert aus dem 23. Jahrhundert v. Chr. im babylonischen „Eshmuna Code“ im alten Mesopotamien (Fu, 1997; Wilkinson, 2002).

Im Laufe der folgenden Jahrhunderte entwickelte sich ein allgemeines Verständnis für die Krankheit. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde der erste Impfstoff gegen Tollwut von Pasteur und Kollegen entwickelt (Pasteur, 1885). Die Ätiologie der Krankheit war zu dieser Zeit noch unbekannt. Im Jahr 1903 beschrieb Negri eosinophile Einschlusskörperchen, identifizierte sie als Protozoen und bezeichnete sie als Tollwuterreger (Kristensson, et al., 1996). Diese intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen, die im Nervengewebe als „Negri-Körperchen“ bezeichnet werden, haben in der Vergangenheit einen wichtigen Stellenwert bei der Diagnose der Infektion eingenommen. Mit Einführung der Elektronenmikroskopie sowie der Ultrazentrifugations- und Ultrafiltrationstechniken gelang Virologen in den 60er und 70er Jahren des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal eine Darstellung der Morphologie des Virus, weiterhin wurden der chemische Aufbau, die antigenetischen Eigenschaften und die Kultivierungsmöglichkeiten für die Tollwuterreger erforscht (Wilkinson, 2002).

Trotz der umfangreichen Forschung und der Entwicklung in den letzten hundert Jahren stellt Tollwut bis heute weltweit eine Bedrohung der menschlichen Gesundheit dar.

### 1.1.1 Der Erreger

#### 1.1.1a Taxonomie

Die Erreger der Tollwut gehören zum Genus *Lyssavirus* aus der Familie *Rhabdoviridae*, die zusammen mit den Familien *Bornaviridae*, *Filoviridae* und *Paramyxoviridae* der Ordnung *Mononegavirales* zugeordnet wird (Tordo, et al., 2005).

Das Genus *Lyssavirus* wurde zunächst auf der Basis der Reaktivität von polyspezifischen Seren und monoklonalen Antikörpern in vier Serotypen unterteilt: 1. Rabies Virus (RABV), 2. Lagos Bat Virus (LBV), 3. Mokola Virus (MOKV) und 4. Duvenhage Virus (DUVV). Nach Isolierung weiterer Lyssaviren und Charakterisierung mehrerer Gene wurden sieben Genotypen unterschieden: 1. RABV, 2. LBV, 3. MOKV, 4. DUVV, 5. European Bat Lyssavirus 1 (EBLV-1), 6. European Bat Lyssavirus 2 (EBLV-2) und 7. Australian Bat Lyssavirus (ABLV). Diese Genotypen konnten in zwei Phylogruppen unterteilt werden: Phylogruppe I mit den Genotypen 1, 4, 5, 6 und 7, und Phylogruppe II, welche die Genotypen 2 und 3 enthält (Tabelle 1.1). Viren jeder Phylogruppe unterscheiden sich in ihrer Virulenz und Immunogenität (Badrane, et al., 2001; Tordo, et al., 2005; WHO, 2004). Derzeit werden innerhalb des Genus die oben beschriebenen Genotypen als Spezies bezeichnet. Einige neuere Isolate müssen noch charakterisiert werden, um ihre Zugehörigkeit innerhalb des Genus zu bestimmen (Tabelle 1.1).

Alle Virusstämme in den derzeit verfügbaren Impfstoffen gehören zur Spezies Rabies Virus. Tollwutvirusstämme, die zur Impfstoffproduktion eingesetzt werden, sind u.a. PV (Pasteur Virus), CVS (Challenge Virus Standard), PM (Pitman-Moore), FluryLEP (low egg passage Flury Stamm), FluryHEP (high egg passage Flury Stamm), ERA (Evelyn Rokitniki Abelseth) und SAD (Street-Alabama-Dufferin).

Tabelle 1.1

*Einteilung von Lyssaviren.*

Spezies	Abkürzung
Rabies Virus	RABV
Lagos Bat Virus	LBV
Mokola Virus	MOKV
Duvenhage Virus	DUVV
European Bat Lyssavirus type 1	EBLV-1
European Bat Lyssavirus type 2	EBLV-2
Australian Bat Lyssavirus	ABLV
Nicht zugeordnete Viren innerhalb des Genus:	
Rochambeau Virus	RBUV
Aravan Virus	ARAV
Khujand Virus	KHUV
Irkut Virus	IRKV
West Caucasian Bat Virus	WCBV

### 1.1.1b Epidemiologie

Die Tollwut ist eine Zoonose, die mit wenigen Ausnahmen weltweit verbreitet ist. Viele Säugetierspezies spielen eine Rolle bei der Persistenz des Erregers und der Übertragung der Krankheit. Terrestrische Spezies, hauptsächlich wilde Carnivoren (z. B. Füchse, Dachse, Mungos, Waschbären, Stinktiere, Wölfe, Kojo-ten) und Haustiere (z. B. Hunde, Katzen, Rinder, Schafe, Pferde) gelten welt-weit als Wirte für RABV, ebenso Fledermäuse in Amerika. Fledermäuse bilden das Reservoir für die meisten Spezies der Lyssaviren, die eine engere geogra-phische Verbreitung zeigen (Tabelle 1.2). Das Reservoir bzw. der Vektor für MOKV ist bisher nicht bekannt (Badrane, et al., 2001; WHO, 2004).

Die Tollwut tritt in mehreren epidemiologischen Formen auf (Kaaden, 2003; Lyles und Rupprecht, 2007; WHO, 2004):

- i. Die silvatische Tollwut – hierbei handelt es sich um die Infektion von Wildtieren in Wäldern oder in nicht-städtischen Gebieten mit wilden Carnivoren als Hauptüberträgern.

- ii. Die urbane Tollwut – diese wird durch Haustiere verbreitet. Der Hund stellt den Hauptüberträger dar. Aufgrund des engen Kontaktes zu dem domestizierten Tier ist der Mensch besonders gefährdet.
- iii. Die Fledermaustollwut.

Tabelle 1.2

*Vektoren und geographische Verbreitung von Lyssaviren.*

Spezies	Vektor	Geographische Verbreitung
Rabies Virus	Carnivoren - weltweit Fledermäuse - Amerika	weltweit (mit Ausnahme der Antarktis und einigen von terrestrischer Tollwut freien Ländern)
Lagos Bat Virus	fruchtfressende Fledermäuse ( <i>Megachiroptera</i> )	Afrika (Sub-Sahara)
Mokola Virus	Unbekannt	Afrika (Sub-Sahara)
Duvenhage Virus	insektenfressende Fledermäuse	südliches Afrika
European Bat Lyssavirus Typ 1	insektenfressende Fledermäuse ( <i>Eptesicus serotinus</i> )	Europa
European Bat Lyssavirus Typ 2	insektenfressende Fledermäuse ( <i>Myotis spp.</i> )	Europa
Australian Bat Lyssavirus	frucht-/insektenfressende Fledermäuse ( <i>Megachiroptera</i> / <i>Microchiroptera</i> )	Australien

Die Überträger sowie die Verbreitung der Tollwut sind weltweit unterschiedlich. Tollwut wird in vielen Ländern fast nur durch terrestrische Wirte, wie z.B. Wildtiere in Nordamerika und insbesondere Füchse in Europa oder Hunde in den meisten Entwicklungsländern, übertragen. Fledermäuse sind in einigen Teilen der Welt wie Amerika, Afrika und Australien wichtige Reservoirs. Nach Schätzung der World Health Organisation (WHO) sterben weltweit jährlich mehr als 55.000 Menschen an Tollwut und über 10 Millionen unterziehen sich



einer postexpositionellen Prophylaxe (PEP) wegen eines erwiesenen oder vermuteten Kontakts mit einem tollwutinfizierten Tier (WHO, 2003). In Asien herrscht die höchste menschliche Sterblichkeit durch Tollwut mit ca. 31.000 Todesfällen pro Jahr, gefolgt von Afrika mit ca. 24.000 Todesfällen.

Als Bekämpfungsmaßnahmen zur Kontrolle der Tollwut wurden hauptsächlich massive Impfkampagnen für Hunde und Wildtiere durchgeführt. Der Erfolg dieser Kampagnen zeigte sich durch Verringerung der Fallzahlen z.B. in Lateinamerika und in einigen asiatischen Ländern. Viele europäische Länder haben insbesondere durch die orale Immunisierung der Füchse die terrestrische Tollwut erfolgreich eliminiert oder stark reduziert.

Viele Länder und Gebiete gelten nach WHO und OIE (Office International des Epizooties) als tollwutfrei. Kriterien dafür sind die routinemäßige Durchführung eines Monitoring-Programmes, die Beachtung strenger Importbestimmungen sowie das Fehlen einer Lyssavirus-Infektion bei Mensch und Tier während der vorherigen zwei bzw. drei Jahre. Diese Definition umfasst gemäß WHO die Tollwut bei terrestrischen Säugetieren und Fledermäusen. Als Folge gelten Regionen mit Fledermaus-Tollwut gemäß WHO nicht als tollwutfrei (OIE, 2006; WHO, 2004). Zu diesen Ländern gehören: Finnland, Niederlande, Italien, die Schweiz, Frankreich, Belgien sowie Luxemburg. Viele tollwutfreie Länder und Gebiete sind geographisch isoliert, beispielsweise Inseln wie Japan, Neuseeland, Barbados, die Malediven oder die Seychellen. Für europäische Länder wie z.B. Großbritannien, Griechenland, Portugal und die skandinavischen Länder sowie Uruguay und Australien gilt ebenfalls der Status der Tollwutfreiheit. Auch die Antarktis ist frei von der Tollwut (Abbildung 1.1).

### Presence/ Absence of Rabies worldwide - 2006

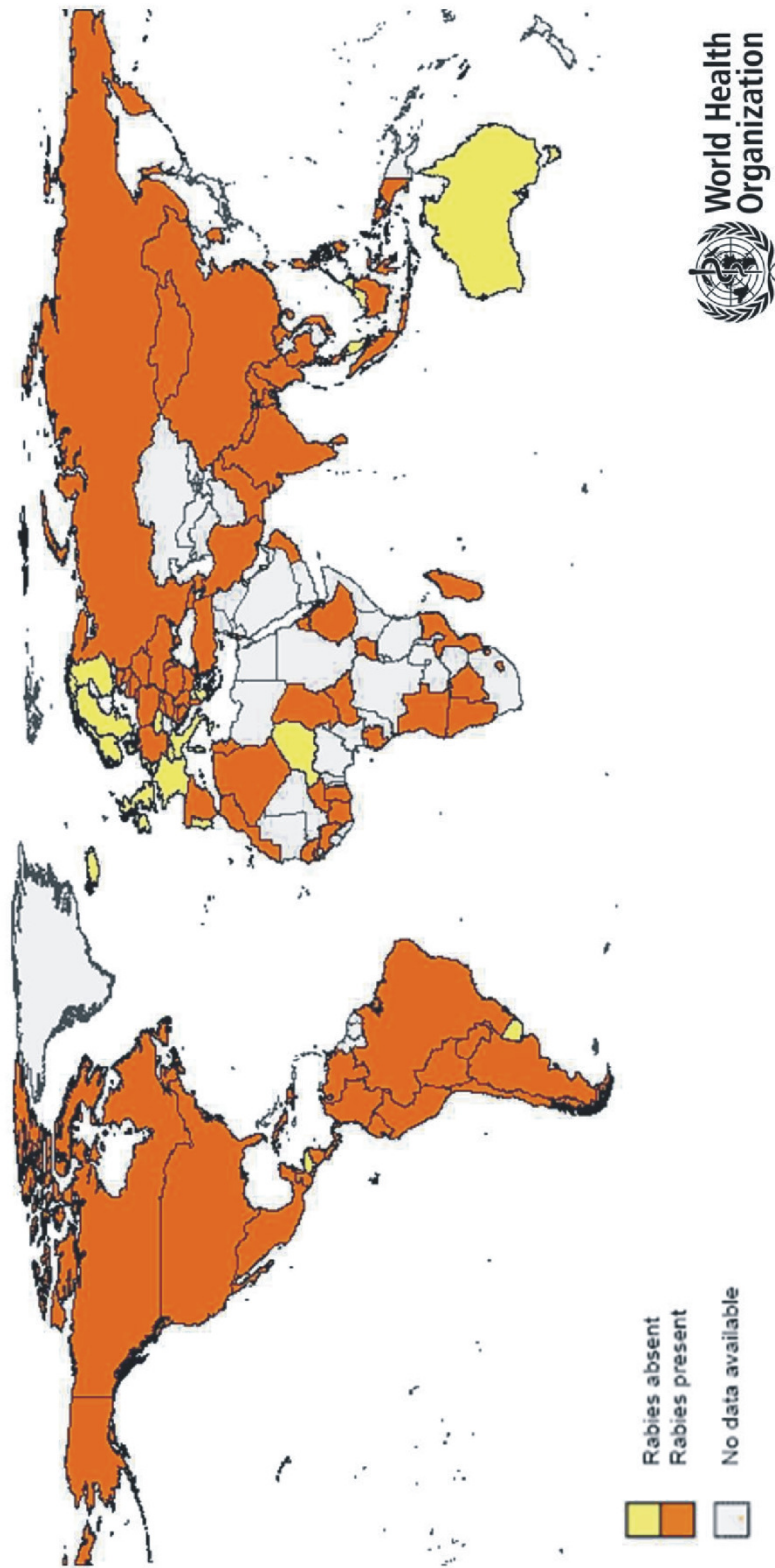


Abbildung 1.1. Verteilung der Tollwut.

Vorkommen von Tollwut sowie Freiheit von Tollwut weltweit. Stand 2006. Quelle: World Health Organization (WHO)

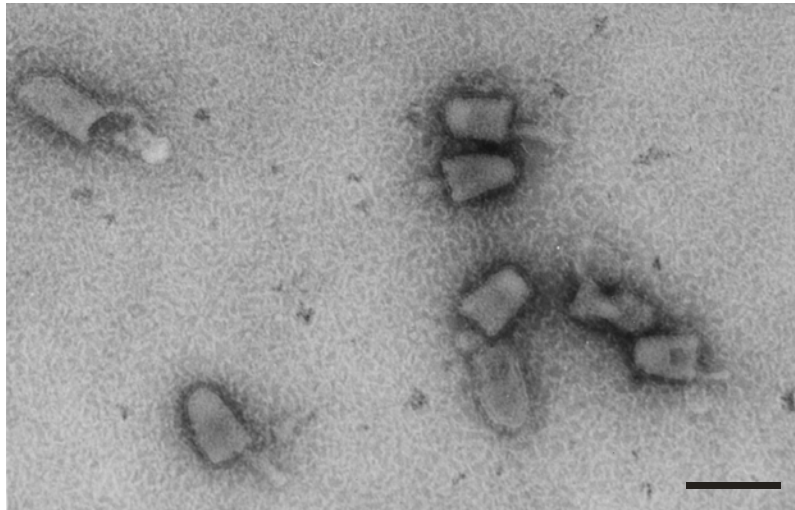
### 1.1.1c Struktur und Morphologie des Erregers

Lyssaviren besitzen eine unsegmentierte, einzelsträngige RNS mit negativer Polarität (Sokol, et al., 1969) und einer Größe von ca. 12 Kilobasen (Bourhy, et al., 1989; Conzelmann, et al., 1990; Tordo, et al., 1986; , 1988; Warrilow, et al., 2002). Das virale Genom kodiert in 3' zu 5' Richtung die fünf Strukturproteine: Nukleo- (N), Phospho- (P), Matrix- (M), Glyko- (G) und Largeprotein (L). Nichtkodierende intergenische Sequenzen haben variable Längen (Di- oder Pentanukleotide). Der nichtkodierende Bereich zwischen dem Glyko- und dem Largeprotein wird als Pseudogen ( $\Psi$ ) bezeichnet und umfasst im Rabies Virus Genom 423 Basen, im Mokola Virus Genom 504 Basen und im Australian Bat Lyssavirus Genom 475 Basen (Gould, et al., 1998; Le Mercier, et al., 1997; Tordo, et al., 2005; Tordo, et al., 1986).

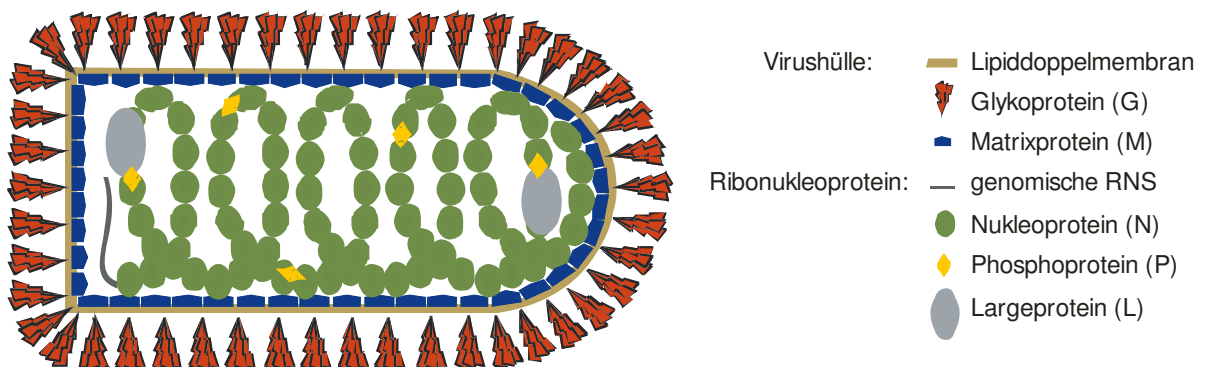
Viruspartikel besitzen zwei strukturelle Untereinheiten, das Ribonukleoprotein (RNP) und die Virushülle. Das RNP besteht aus der genomischen RNS sowie dem Nukleo-, Phospho- und Largeprotein. Das RNP bildet in Verbindung mit dem Matrixprotein die typische zylindrische Form der Virionen. Diese Struktur wird durch die Hülle umgeben, eine Lipiddoppelmembran, in welche das Glykoprotein in Form von Trimeren eingelagert ist. Viruspartikel haben eine Länge von ungefähr 180 nm und eine Breite von 75 nm (Abbildung 1.2).

Die Virusproteine unterscheiden sich in ihren relativen Molekulargewichten, der Kopienanzahl je Virion, den posttranslationalen Modifikationen und in ihrer Funktion. In Tabelle 1.3 sind einige Charakteristika der Proteine zusammengefasst.

A.



B.



C.



Abbildung 1.2. Struktur und Morphologie von Tollwutvirus.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Virionen. Balken: 200 nm. (B) Schematischer Aufbau eines Viruspartikels. (C) Genomorganisation von Lyssaviren.

Tabelle 1.3  
*Charakteristika der Proteine von Lyssaviren.*

Protein	Apparentes Molekulargewicht (kDa)	Relative Kopienanzahl per Virion	Beschreibung
Nukleoprotein	57	1750	450 Aminosäuren phosphoryliert Bestandteil des Nukleokapsids in Verbindung mit der RNS Zielantigen für T-Helferzellen
Phosphoprotein	38-41	950	297 Aminosäuren verschiedene Grade der Phosphorylierung Bestandteil des Nukleokapsids Cofaktor der RNS-abhängigen RNS Polymerase
Matrixprotein	25	1650	202 Aminosäuren palmitoyliert Verbindung zwischen Nukleokapsid und Hülle zuständig für Zusammenbau (Assembly) und Ausknospen (Budding) des Virus (Virusmorphologie)
Glykoprotein	65-70	1800	524 Aminosäuren glykosyliert und palmitoyliert als Trimer in der Lipiddoppelmembran zuständig für Virusadsorption an die Wirtszelle induziert neutralisierende Antikörper
Largeprotein	180	20-150	2127 Aminosäuren posttranslationale Modifikationen nicht bekannt Bestandteil des Nukleokapsids RNS-abhängige RNS Polymerase

### 1.1.1d Replikation

Mit Hilfe des viralen Glykoproteins binden Tollwutviren an Rezeptoren auf der Membran der Wirtszellen. Diese Rezeptoren können unspezifisch (Zellkultur) oder spezifisch (Wirtsorganismus) sein. Für die unspezifische Bindung sind Kohlenhydrate, Phospholipide, Ganglioside und Proteine der Zellmembran identifiziert worden (Conti, et al., 1986; Superti, et al., 1986; Superti, et al., 1984). Spezifische Rezeptoren scheinen für den Neurotropismus des Virus verantwortlich zu sein. Eine spezifische Bindung findet an neuromuskulären Verbindungen statt, wo das Virus mit dem Acetylcholin-Rezeptor kolokalisiert (Lentz, et al., 1982; Lewis, et al., 2000). Weitere Bindungsmoleküle auf der neuronalen Zellmembran sind das neuronale Zelladhäsionsmolekül und der p75 Neurotrophin-Rezeptor (Langevin, et al., 2002; Thoulouze, et al., 1998).

Nach dem Eindringen der Viruspartikel durch Endocytose vermittelt das Glykoprotein abhängig von einem niedrigen pH-Wert die Fusion mit der Endosomenmembran, und das Ribonukleoprotein gelangt in das Zytoplasma (Uncoating des Virus) (Gaudin, et al., 1993). Das Minusstrang-RNS-Genom wird entweder in ein Antigenom voller Länge oder in fünf mRNS transkribiert, die für die viralen Proteine kodieren. Das Antigenom dient als Matrize für die Replikation von neuen Virusgenomen mit negativer Polarität. Bedingt durch den diskontinuierlichen Mechanismus der Transkription entsteht ein mRNS Gradient. Somit wird das N-Gen am häufigsten und das L-Gen am wenigsten transkribiert (Iverson und Rose, 1981). Die viralen Proteine N, P, M und L werden durch freie Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert. Das G-Protein wird durch Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und in das Lumen des ER transloziert. Während des Weges vom ER durch den Golgi-Apparat zur Zellmembran wird es glykosiliert (Gaudin, 1997; Shakin-Eshleman, et al., 1992).

N- und P-Protein bilden Aggregate, die zu intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen (in vivo: Negrikörperchen) führen oder die virale RNS enkapsidieren. Der Komplex N-P-RNS bildet zusammen mit dem L-Protein das Ribonukleoprotein, mit dem das M-Protein assoziiert. So prägt sich eine zylindrische

Struktur aus, welche ihrerseits mit den in der Zellmembran verankerten G-Proteintrimeren interagiert (Mebatsion, et al., 1999). Viruspartikel knospen von der Plasmamembran aus (Budding) (Abbildung 1.3).

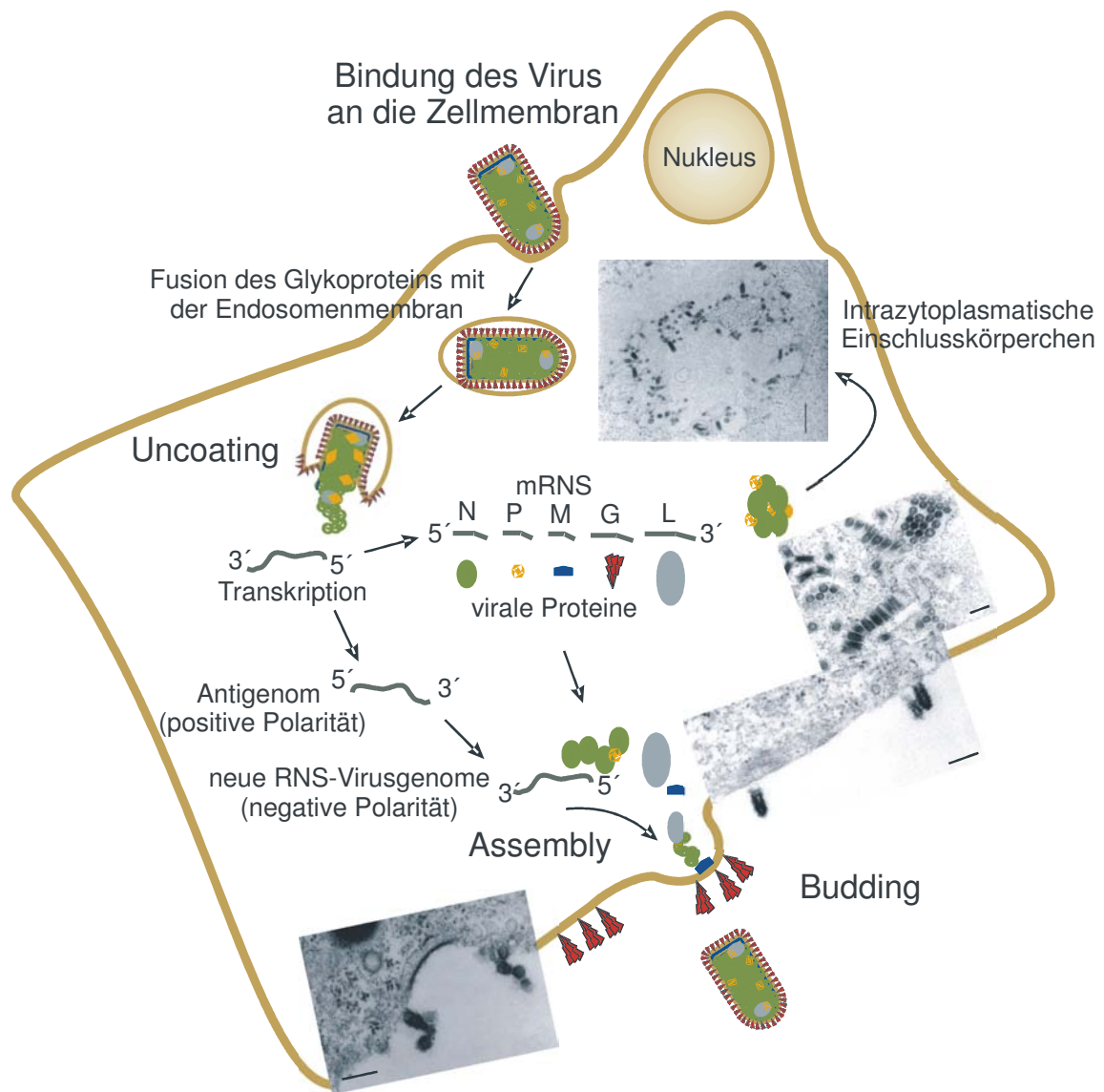


Abbildung 1.3. Replikationszyklus von Tollwutvirus.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen: Mit Tollwutvirusstamm CVS infizierte BHK-21 Zellen. Balken: 200 nm.



### **1.1.2 Pathogenese**

Tollwutvirus ist ein neurotropes Virus, das eine akute Enzephalomyelitis mit einer hohen Letalität bei Menschen und Tieren verursacht.

#### **1.1.2a Übertragung**

Die Infektion erfolgt durch direkten Kontakt mit virushaltigem Speichel infizierter Tiere. In den meisten Fällen geschieht dies durch einen Biss, aber auch durch Exposition von Schleimhäuten oder Hautverletzungen. In seltenen Fällen findet die Übertragung von Tollwutvirus auch durch Tröpfcheninfektion oder als Folge einer Organtransplantation statt (Johnson, et al., 2006; Sriaroon, et al., 2006; Srinivasan, et al., 2005; WHO, 2004; Winkler, et al., 1973).

#### **1.1.2b Inkubationszeit**

Die Inkubationszeit kann zwischen wenigen Tagen bis zu einigen Jahren schwanken (Hanna, et al., 2000; Smith, et al., 1991), beträgt aber in der Mehrzahl der Fälle 20 bis 90 Tage. Die Länge der Inkubationszeit scheint von einer Vielzahl von Faktoren abzuhängen, u.a. von der Anzahl der Tollwutvirusrezeptoren in den betroffenen Geweben, dem Grad der Innervation der Gewebe an der Bissstelle, der Nähe der Bisswunde zum zentralen Nervensystem (ZNS), dem Umfang der Gewebszerstörung, der eingetretenen Virusmenge, den Eigenschaften des inokulierten Virusstammes und dem Immunstatus des Wirtes (Baer, et al., 1990; Charlton, et al., 1997; Jackson, 2002b).

#### **1.1.2c Virale Infektion und Ausbreitung**

An der Infektionsstelle vermehrt sich das Virus in der Regel zunächst in Muskelzellen. Anschließend erfolgt die Infektion von Nervenzellen und die Ausbreitung entlang der peripheren Nerven. Das Virus wandert in den peripheren Nerven mit ungefähr 50-100 mm pro Tag durch den retrograden axonalen

Transport zum ZNS (Tsiang, et al., 1991). Sobald das Virus das ZNS erreicht hat, erfolgt eine massive Virusreplikation und schnelle Verbreitung durch transsynaptischen Transport. Die zentrifugale Virusausbreitung vom ZNS durch efferente Nerven führt schließlich zur Infektion vieler Gewebe, einschließlich Speicheldrüsen, Retina, Hornhaut, Haarfollikeln, Herz- und Skelettmuskulatur, Nebennieren, Pankreas und Leber (Jackson, 2002b; , 2003; Warrell und Warrell, 2004) (Abbildung 1.4).

Bestimmender Faktor für den Virusneurotropismus und die Neurovirulenz ist das G-Protein des Tollwutvirus. Ein einziger Aminosäureaustausch an Position 333 von Arginin zu z.B. Glutamin, Glycin oder Isoleucin führt zu Verminderung oder Verlust der Neurovirulenz (Etessami, et al., 2000; Kankanamge, et al., 2003; Seif, et al., 1985; Tuffereau, et al., 1989). Durch den Austausch werden die Effektivität der Virusverbreitung sowie der Zelltropismus beeinflusst (Mebatsion, 2001; Yan, et al., 2002).

Für das Phosphoprotein konnte eine Interaktion mit der zytoplasmatischen „Dynein Light Chain 1“ (DLC1) gezeigt werden. Dynein ist in den Organelltransport durch retrograden axonalen Transport involviert. Offenbar spielt die Wechselwirkung des P-Proteins mit DLC1 beim axonalen Transport des RNPs entlang der Mikrotubuli in Neuronenzellen eine Rolle (Finke, et al., 2004; Jacob, et al., 2000; Mebatsion, 2001; Raux, et al., 2000).

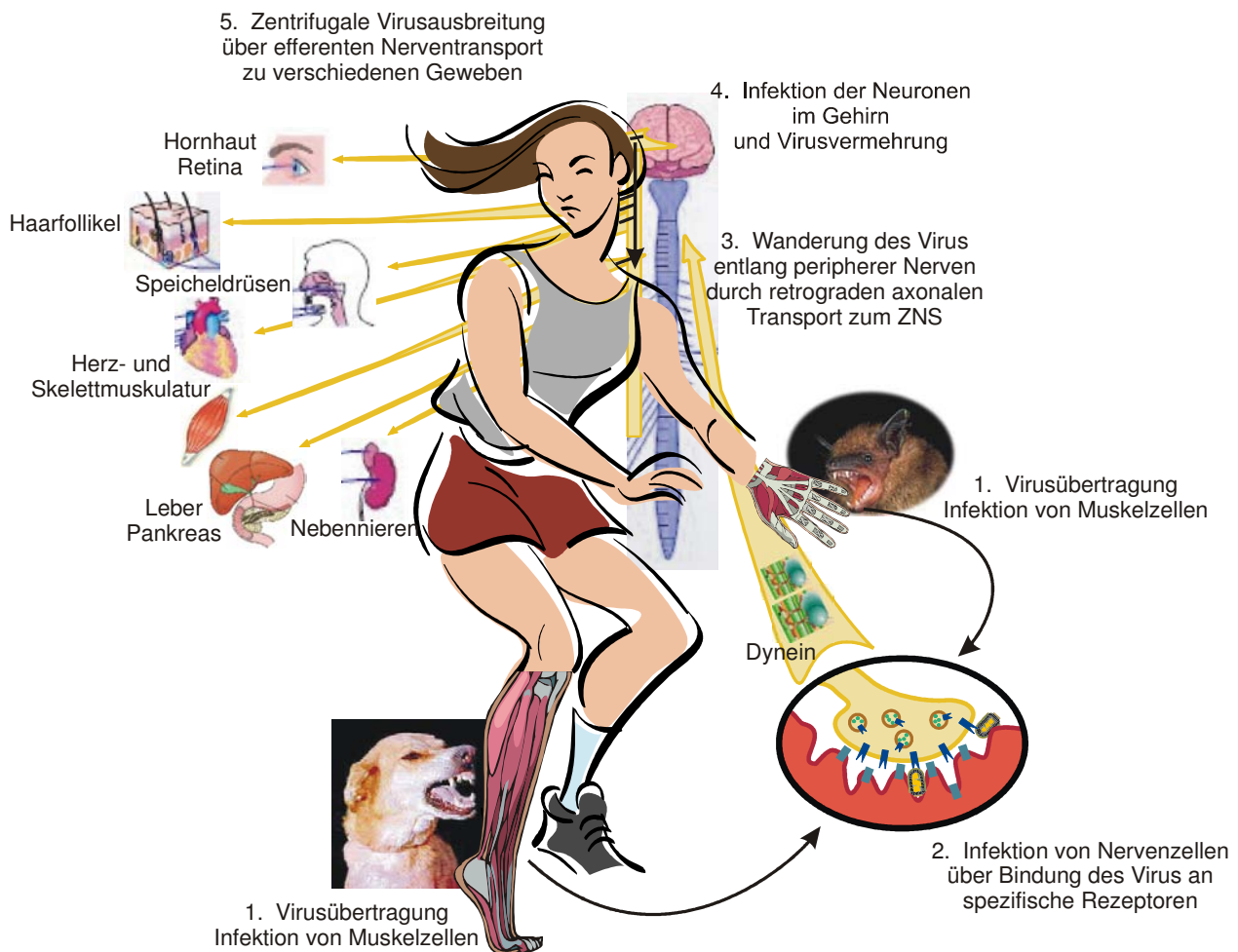


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung der Pathogenese von Tollwutvirus.

### 1.1.2d Pathologie

In den meisten Fällen manifestiert sich die Tollwut als akute Enzephalomyelitis, die durch eine lymphozytäre Infiltration charakterisiert ist. Pathognomonisch bei einer Tollwutvirusinfektion sind die kleinen eosinophilen Einschlusskörperchen im Zytoplasma infizierter Neuronen, die sogenannten Negrikörperchen. Diese wurden von Adelchi Negri bereits im Jahr 1903 entdeckt (Kristensson, et al., 1996). Unterschiedliche Grade degenerativer neuronaler Veränderungen lassen sich im ZNS beobachten (Baloul und Lafon, 2003; Iwasaki, et al., 1985; Li, et al., 2005; Sarmiento, et al., 2006; Wang, et al., 2005).

Der Grad der histopathologischen Veränderungen ist variabel und entspricht nicht unbedingt dem Schweregrad der klinischen Krankheit (Iwasaki und Tobita, 2002). Offenbar hat die Infektion mit dem Tollwutvirus neben den histopathologischen Veränderungen auch einen Effekt auf die Funktion von Nervenzellen. Veränderungen der Serotonin-, Acetylcholin- und GABA-Neurotransmission (Fu und Jackson, 2005; Ladogana, et al., 1994; Li, et al., 2005; Warrell und Warrell, 2004) sowie Alteration der Funktion von Ionenkanälen in der neuronalen Membran (Iwata, et al., 1999; Iwata, et al., 2000) und ein Einfluß auf die Expression der Gene in Neuronzellen (Prosniak, et al., 2001; Prosniak, et al., 2003b) sind experimentell nachgewiesen worden.

### **1.1.2e Immunologie**

#### **1.1.2ea Allgemeine Einführung**

Durch eine Tollwutvirusinfektion werden unterschiedliche spezifische und unspezifische Immunmechanismen im Organismus aktiviert. Virusantigene werden nach Infektion oder Phagozytose prozessiert und in Form von Peptidfragmenten von dem Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex - MHC) den T-Lymphozyten (T-Killerzellen und T-Helferzellen) präsentiert. Die MHC-Moleküle liegen in zwei Klassen auf der Oberfläche von Zellen vor. MHC-Moleküle der Klasse I präsentieren endogene Antigene, d.h. Moleküle, die innerhalb einer Zelle synthetisiert wurden, und sie werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen präsentieren exogene Antigene, die von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Zellen aufgenommen wurden.

T-Killerzellen (CD8+) erkennen über den MHC-Klasse-I-Weg präsentierte Peptidfragmente. Aktivierte CD8+ T-Lymphozyten produzieren Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und zerstören infizierte Zellen durch zytotoxische Reaktionen mittels Perforinen und Proteasen. T-Helferzellen (CD4+) erkennen dagegen Peptidfragmente, die durch den MHC-Klasse-II-Weg in APCs prozessiert und präsen-

tiert werden. Aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich in zwei Zelltypen, die T-Helfer 1 (Th1) und die T-Helfer 2 (Th2) Zellen, die sich im Muster der synthetisierten Zytokine unterscheiden (Liew, 2002; Mosmann, et al., 1986).

Tollwutviren sind neurotrop und befallen somit bevorzugt das ZNS, welches als ein immunologisch privilegiert regionales System angesehen werden kann. Es weist spezifische Eigenschaften auf wie das Vorhandensein einer Blut-Hirn-Schranke (Blood-Brain Barrier - BBB), das Fehlen eines konventionellen lymphatischen Systems und sekundärer lymphoider Organe wie lokaler Lymphknoten (Pedemonte, et al., 2006; Xiao und Link, 1998). Nach einer Infektion können Virusantigene von ZNS-Zellen (hauptsächlich Mikrogliazellen sowie Astrozyten und endotheliale Zellen) (Shrikant und Benveniste, 1996) und dendritischen Zellen in Meningen und Liquor (Fischer, et al., 2000; Karman, et al., 2004; Pashenkov, et al., 2001) präsentiert werden. Als Folge können aktivierte Lymphozyten das ZNS infiltrieren. Die Aktivität dieser Lymphozyten wird im ZNS durch verschiedene immunsuppressive Mechanismen unterdrückt. Diese Mechanismen schließen eine verminderte Antigenpräsentation (niedrige MHC-Molekül-Expression und Fehlen professioneller APCs), Apoptose und Produktion von immunsupprimierenden Faktoren ein. Die Unterdrückung einer Immunantwort innerhalb des ZNS beruht auf einer Reihe von Faktoren: (i) Aktivierungszustand der Mikroglia, (ii) Niveau von Zytokinen und Zytokinrezeptoren in den Glia- und Immunzellen, (iii) Vorhandensein, Konzentration und Lokalisation von Zytokinen mit immunstimulierender bzw. hemmender Wirkung, (iv) Exposition von Zellen gegenüber Zytokinen (Xiao und Link, 1998).

Da Neuronen eine stark begrenzte Regenerationskapazität haben, dient diese einzigartige Regulation der Immunantwort im ZNS dem Schutz der Nervenzellen vor einer überschießenden Immunantwort, die zum Untergang der Zellen führen könnte.

### 1.1.2eb Immunantwort gegen Tollwutvirus

Die zelluläre sowie die humorale Immunreaktion spielen eine wichtige Rolle in der Protektion des Organismus vor den Folgen einer Tollwutvirusinfektion. Untersuchungen an CD4+-depletierten oder CD4+-Knockout-Mäusen zeigten, dass die Produktion virusneutralisierender Antikörper (VNA) nach Tollwutvirus-Infektion stark beeinträchtigt ist, und die Überlebensrate bei diesen Tieren nahe bei 0 % liegt (Perry und Lodmell, 1991; Xiang, et al., 1995). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass B-Zell- oder B- und T-Zell-Knockout-Mäuse nach intranasaler Infektion mit einem attenuierten Tollwutvirusstamm einen progressiven Krankheitsverlauf entwickeln und der Infektion erliegen (Hooper, et al., 1998). Offenbar spielen VNA sowie die Induktion der T-Helferzellen eine kritische Rolle in der Entwicklung einer protektiven Immunantwort.

CD8+ T-Zellen leisten vermutlich einen Beitrag zur Antikörper-vermittelten Virusinaktivierung bzw. Virusentfernung aus dem ZNS durch eine Verstärkung der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Hooper, et al., 1998).

Eine Immunsuppression kann nicht nur als Folge einer neuroimmunen Deregulation, sondern auch durch das Tollwutvirus selbst ausgelöst werden. So können hoch virulente Virusstämme (z.B. Feldvirusisolate oder CVS „Fixed“ Stamm), die „Fatal Encephalitic Rabies“ auszulösen vermögen, die Zell-vermittelte Immunantwort in Mäusen nach einer peripheren Infektion hemmen (Hirai, et al., 1992; Perrin, et al., 1996; Wiktor, et al., 1977). Außerdem wurden nach Infektion mit dem CVS-Stamm (nach intramuskulärer Inokulation) im ZNS eine Verminderung der Entzündungsantwort und eine Zerstörung der wandernden T-Zellen durch Apoptose beobachtet (Baloul und Lafon, 2003). Im Gegensatz dazu wird eine Infektion des ZNS durch Virusstämme mit geringer Virulenz bzw. durch solche, die „abortive Rabies“ verursachen, mittels T-Lymphozyten und die Induktion neuronaler Apoptose kontrolliert (Baloul und Lafon, 2003; Galelli, et al., 2000). Im Fall einer Infektion mit dem Stamm PV, welcher eine irreversible schlaffe Paralyse verursacht, konnte eine akute Inflammation im ZNS und keine Zerstörung wandernder T-Zellen gezeigt wer-

den. Als Folge werden PV-infizierte Neuronen zerstört und die Ausbreitung der Infektion innerhalb des Gehirns unterbrochen (Baloul und Lafon, 2003). In einer anderen Studie (Phares, et al., 2006) wurden Änderungen in der BBB-Permeabilität, eine Erhöhung der CD4+ und CD8+ Zellen und die Ansammlung von B-Lymphozyten im Kleinhirn nach intranasaler Infektion mit dem attenuierten Stamm CVS-F3 beschrieben. Hier verlief die Virusinfektion ohne klinische Folgeschäden.

Eine Analyse der Expression des viralen Glykoproteins im ZNS von Mäusen nach Infektion mit einem virulenten bzw. einem attenuierten Virusstamm zeigte eine Restriktion der Expression von G-Protein bei der Infektion mit dem virulenten Stamm. Möglicherweise ist diese Restriktion ein Mechanismus des Virus, um die Aktivierung der angeborenen Immunantwort zu vermeiden (Wang, et al., 2005).

### **1.1.2ec Zielproteine der antiviralen Immunantwort**

Die wichtigsten viralen Antigene, die eine schützende Immunantwort gegen Tollwut induzieren, sind das Glykoprotein und das Nukleoprotein. Gegen beide Proteine werden hohe Antikörpertiter gebildet. Im Gegensatz dazu induzieren Phospho- und Matrixprotein nach Infektion nur geringe Titer (Takita-Sonoda, et al., 1993).

#### **- Das Glykoprotein**

Das Glykoprotein induziert die Synthese neutralisierender Antikörper und stimuliert die Proliferation spezifischer T-Helfer- und T-Killerzellen (Benmansour, et al., 1991; Celis, et al., 1988; Marissen, et al., 2005; Xiang, et al., 1995). Verschiedene konformationelle sowie lineare Epitope in der extrazytoplasmatischen Domäne des Proteins unterschiedlicher Virusstämme wurden identifiziert und als Antigenregionen (Antigenic sites) I bis VI, minor site a; G1 und Epitop CR-57 bezeichnet (Benmansour, et al., 1991; Dietzschold, et al., 1988; Lafon, et al., 1984; Lafon, et al., 1983; Marissen, et al., 2005; Prehaud, et al., 1988)

(Abbildung 1.5). Von den meisten neutralisierenden monoklonalen Antikörpern werden die Antigenregionen II und III erkannt (Benmansour, et al., 1991).

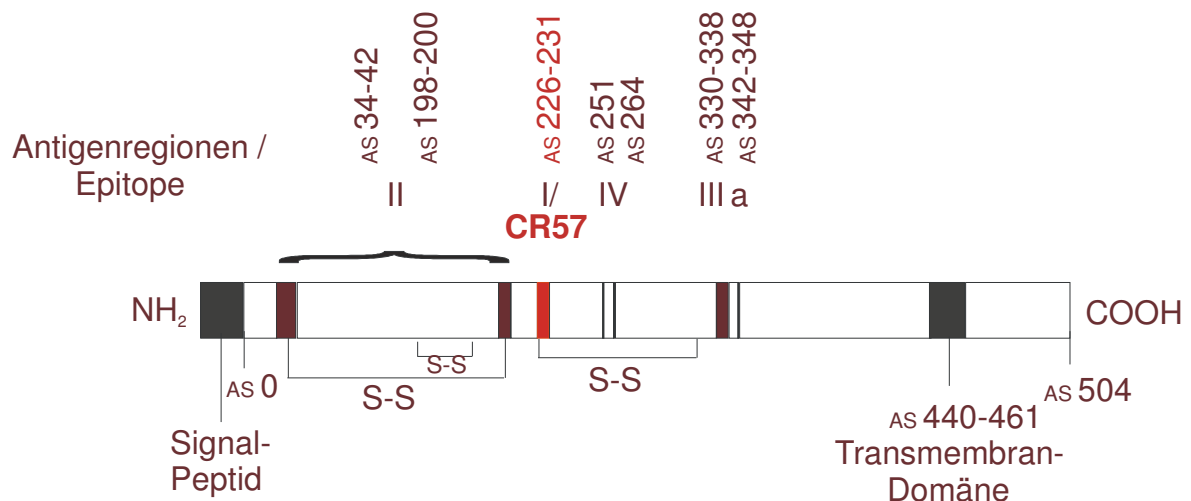


Abbildung 1.5. Schematischer Aufbau des Glykoproteins des Tollwutvirus.

S-S: Disulfid-Brücken; AS: Aminosäure.

#### - Das Nukleoprotein

Das Nukleoprotein trägt lineare und konformationelle Epitope, die als Antigenregionen (Antigenic sites) I bis IV bezeichnet wurden (Goto, et al., 2000; Goto, et al., 1995; Lafon und Wiktor, 1985; Minamoto, et al., 1994). Das Protein stellt ein Zielantigen für T-Helferzellen dar (Celis, et al., 1988; Dietzschold, et al., 1987; Ertl, et al., 1989). Virales Ribonukleoprotein oder das Nukleoprotein allein können einen gewissen Schutz gegen eine periphere Virusinokulation in Tieren ohne nachweisbaren Titer neutralisierender Antikörper bewirken (Fekadu, et al., 1992; Fu, et al., 1991; Lodmell, et al., 1993).

#### - Das Phosphoprotein

Durch den Einsatz verschiedener monoklonaler Antikörper gegen das Phosphoprotein konnten mehrere Antigenregionen im Protein identifiziert werden (Dietzschold, et al., 1987; Lafon und Wiktor, 1985; Raux, et al., 1997). Die meis-



ten dieser Antigenregionen scheinen aus linearen Epitopen zu bestehen (Raux, et al., 1997). Unterschiede bestehen im Hinblick auf Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Antigenregionen bei verschiedenen Lyssaviren (Dietzschold, et al., 1987; Nadin-Davis, et al., 2000).

### **1.1.2ed Die Immunantwort nach Impfung gegen Tollwut**

Schutz gegen Viruskrankheiten wird hauptsächlich durch neutralisierende Antikörper und/oder T-Lymphozyten (T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxische T-Killerzellen (CD8+)) vermittelt. Impfstoffe, die attenuierte Viren enthalten, sowie DNS Vakzinen können eine Antikörper- bzw. eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösen, während inaktivierte Impfstoffe im allgemeinen Antikörper und CD4+ T-Zellen, aber nicht CD8+ T-Zellen induzieren (Esser, et al., 2003; Seder und Hill, 2000). Zugelassene Tollwutimpfstoffe für den Menschen beinhalten inaktivierte Viruspartikel und induzieren daher keine ausgeprägte zytotoxische T-Zellantwort.

Der Impfschutz wird im Wesentlichen durch neutralisierende Antikörper vermittelt. Zur Messung dieser Antikörper eignen sich der „Fluorescent Antibody Virus Neutralisation Test“ (FAVN – Test) (Kapitel 2.2.6) sowie der „Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test“ (RFFIT – Test) (Meslin, et al., 1996; OIE, 2004). Die Höhe der Antikörpertiter wird durch Vergleich mit einem internationalen Standard ermittelt. Ein Titer von  $\geq 0,5$  IU/ml gilt nach Angaben der OIE als ausreichend, um nach Infektion eine Erkrankung an Tollwut zu vermeiden.

### **1.1.3 Klinische Symptomatik**

Die Tollwuterkrankung beginnt beim Menschen mit unspezifischen Prodromalsymptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Anorexie, Lethargie, Erbrechen und allgemeinem Unwohlsein, wobei das Atmungs-, das gastrointestinale und/oder das zentralnervöse System betroffen sind. Lokale Parästhesie im Bereich der

Bissstelle wird häufig als ein Prodromalsymptom beschrieben (Jackson, 2002a; Warrell und Warrell, 2004).

Die Krankheitserscheinungen bei Tieren können grundsätzlich sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Außer Verhaltensänderung (Unruhe oder Apathie) gibt es keine definierten oder spezies-spezifischen klinischen Zeichen von Tollwut. Erste Symptome sind unspezifisch und schließen u.a. Anorexie, Lethargie, Fieber, Dysphagie, Erbrechen, Verstopfung oder Diarrhoe ein. Bei Wildtieren führt Tollwut häufig zum Verlust der angeborenen Scheu vor dem Menschen (Niezgoda, et al., 2002).

Klinische Formen:

A. Rasende Wut (klassische oder enzephalitische Form):

In ungefähr 80 % der Fälle beim Menschen entwickelt sich eine klassische Form von Tollwut. Bei dieser Form gibt es Hyperexzitabilitätsperioden, die meist einige Minuten lang dauern. Diese werden von Perioden bei klarem Bewusstsein abgelöst. Erregbarkeitsepisoden können spontan auftreten oder durch verschiedene sensorische Stimulationen ausgelöst werden. Erkennungszeichen von Nervensystemfunktionsausfällen sind Gesichts- und Zungenschwäche, Hypersalivation, Schluckstörungen, Piloerektion und Herzarrhythmien. Beim Schlucken bestehen Spasmen der Schluck- und Inspirationsmuskulatur. Als Folge kommt es zu einer erheblichen Angst vor dem Trinken. Hydrophobie kommt in 50 bis 80 % der Patienten vor (Jackson, 2002a; Mitrabhakdi, et al., 2005). Häufig entwickelt sich eine schlaffe Paralyse.

Erkrankte Tiere zeigen im Zusammenhang mit Hyperästhesie eine generelle Zunahme der neurologischen Aktivität auf auditive, visuelle oder taktile Stimuli, plötzliche und scheinbar unprovizierte Agitation und extrem aggressives Verhalten. Eine qualitative Veränderung in der Phonation kann ebenso wie eine erhöhte Vokalisierung (ständige unmotivierter Lautäußerungen (Bellen, Miauen, Brüllen, Blöken, usw.)) beobachtet werden. Als Folge von Nervensystemdysfunktion treten Schluckstörungen auf (Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme, vermehrter Speichelfluss) (Niezgoda, et al., 2002).

### B. Stille Wut (paralytische Form):

Paralytische Tollwut kommt in ungefähr 20 % der Fälle beim Menschen vor. Patienten sind zu Beginn der Symptome aufmerksam mit einem normalen Geisteszustand. Erste Zeichen sind Muskelschwäche und schlaffe Lähmungen. Dem Verlauf dieser Form ähnelt das Vollbild des Guillain-Barré-Syndroms (Hemachudha, et al., 2002; Hemachudha, et al., 2005; Jackson, 2002a; Mitrabhakdi, et al., 2005).

Im Fall der stillen Wut bei Tieren kann die Aggressivität völlig fehlen und die Krankheit gleich mit Lähmungserscheinungen beginnen. Klinische Manifestationen können schrittweise Anorexie, Depression, Anzeichen von Hirnnervenfunktionsausfällen und einen verstärkten Speichelfluss einschließen. Später treten Paresen auf und infolge einer Lähmung der Hinterbeine kommt es zum Festliegen (Niezgoda, et al., 2002).

Die Krankheit schreitet mit einer Vielzahl von Komplikationen, hauptsächlich Herz- bzw. Atemausfällen, rasch voran und führt schließlich zum Koma. Die Letalität von Tollwut liegt bei fast 100 %. Der Tod tritt normalerweise innerhalb von 14 Tagen nach Beginn der ersten klinischen Symptome ein. Durch intensive Versorgungsmaßnahmen kann der Eintritt des Todes verzögert werden (Jackson, 2002a).

#### 1.1.4 Diagnose

Wegen der einzigartigen Pathogenese der Tollwut ist es fast unmöglich, die Krankheit während der meist langen und variablen Inkubationszeit nachzuweisen. Auf der Basis klinischer Symptome ist eine Tollwutdiagnose schwierig und unzuverlässig, weil es (mit Ausnahme der Hydrophobie) keine wirklichen pathognomonischen Anzeichen gibt. Außerdem ist es schwierig, die Krankheit von anderen Enzephalitiden zu unterscheiden (Trimarchi und Smith, 2002; WHO, 2004).

Diagnoseverfahren beruhen auf dem Nachweis des infektiösen Virus, eines Virusantigens und/oder der viralen RNS in den peripheren Nerven und Geweben

bzw. dem Nachweis von Antikörpern im Serum und/oder im Liquor cerebrospinalis (Tabelle 1.4). Negative Ergebnisse aller intra vitam durchgeführten diagnostischen Verfahren schließen eine Infektion nicht aus (OIE, 2004; Warrell und Warrell, 2004; WHO, 2004).

Tabelle 1.4

*Diagnose der Tollwut.*

Ziel	Probe	Verfahren
<b>Intra Vitam</b>		
Virusisolierung	Speichel, Liquor, Tränenflüssigkeit	Zellkultur oder „Mouse inoculation test“
Nachweis von Virusantigen	Nackenhautbiopsie	FAT ELISA
Nachweis viraler RNS	Nackenhautbiopsie, Speichel, Liquor, Tränenflüssigkeit	RT-PCR
Nachweis von Antikörpern*	Serum oder Liquor von nicht geimpften Patienten	FAVN RFFIT ELISA
<b>Post mortem</b>		
Virusisolierung	Gehirn (Ammonshorn, Zerebellum und Medulla oblongata)	Zellkultur oder „Mouse inoculation test“
Nachweis von Virusantigen	Abklatschpräparate der Gewebeproben von Hirnstamm, Thalamus, Zerebellum und Hippocampus (Ammonshorn)	FAT ELISA
Nachweis viraler RNS	Gehirn	RT-PCR

*Anmerkungen.* FAT: fluorescent antibody test. FAVN: fluorescent antibody virus neutralisation test. RFFIT: rapid fluorescent focus inhibition test.

\* Virusneutralisierende Antikörper erscheinen in der Regel erst etwa 8 Tage nach dem Auftreten klinischer Symptome (WHO, 2004).

### 1.1.5 Therapie

Zur Behandlung von Menschen nach einer Exposition mit Lyssaviren stehen die aktive und die passive Immunisierung zur Verfügung (Kapitel 1.1.6). Eine kontaminierte Wunde sollte möglichst mit Wasser und Seifenlösung sowie mit einem Antiseptikum (z.B. Ethanol oder Jodid) gereinigt werden. Nach Ausbruch der Krankheit ist eine Palliativbehandlung angezeigt. Starke Beruhigungsmittel und Analgetika sollten gegeben werden, um die quälenden Agoniesymptome zu vermindern (Jackson, et al., 2003; WHO, 2004). Die Behandlung wirkt in der Regel nur lebensverlängernd. Die Tollwutsterblichkeit bei ungeimpften Patienten liegt bei annähernd 100 %. Im Dezember 2004 wurde jedoch ein klinischer Tollwutfall einer 15-jährigen Patientin dokumentiert, die weder prä- noch postexpositionelle Prophylaxe empfangen hatte und dennoch die Erkrankung überlebte. Eine virostatistische Behandlung sowie neuroprotektive Maßnahmen, einschließlich eines induzierten medikamentösen Komas, wurden als Therapie angewandt (CDC, 2004; Jackson, 2006). Nur fünf andere Überlebensfälle sind berichtet worden, in denen die Patienten entweder präexpositionelle Immunisierung oder postexpositionelle Prophylaxe vor dem Auftreten der Erkrankung empfangen hatten. Fast alle Überlebenden zeigten bleibende neurologische Defizite (Warrell und Warrell, 2004).

### 1.1.6 Prophylaxe

Die Erkrankung kann durch rechtzeitige Impfung verhindert werden. Die Immunisierung gegen Tollwut begann mit einem Tollwutimpfstoff, der von Louis Pasteur und Kollegen im Jahr 1885 entwickelt wurde (Pasteur, 1885). Dieser basierte auf attenuiertem Virus, das aus Rückenmarksgewebe infizierter Kaninchen gewonnen wurde.

Um Tollwut beim Menschen zu verhindern, bestehen zwei unterschiedliche Schutzimpfungsschemata: präexpositionelle Immunisierung und postexpositionelle Prophylaxe (PEP).

### **1.1.6a Präexpositionelle Immunisierung**

Präexpositionelle Immunisierung kann mit einem der modernen Impfstoffe (Kapitel 1.1.7) durchgeführt werden und ist bei jeder Person mit erhöhter Gefahr einer Exposition gegenüber Tollwutvirus indiziert. Dazu gehören Personal in Laboratorien mit Tollwutvirusinfektionsrisiko, Tierärzte, Personen, die durch Umgang mit Wildtieren einen häufigen Kontakt zu möglicherweise infizierten Tieren haben (z.B. Jäger, Förster, Personen mit Kontakt zu Fledermäusen) sowie Reisende in enzootischen Gebieten. Das Standardschema besteht aus drei Dosen eines Zellkulturimpfstoffs (Kapitel 1.1.7), der intramuskulär oder intradermal an den Tagen 0 und 7, sowie entweder am Tag 21 oder 28 appliziert werden. Periodische Auffrischungsimpfungen werden für Personen mit einem kontinuierlichen Expositionsrisiko empfohlen. Alternativ können zur Kontrolle die ausreichende Titerhöhe an neutralisierenden Antikörper ( $\geq 0,5$  IU/ml) geprüft werden (Tabelle 1.5) (CDC, 1999; Sehgal, et al., 1995; WHO, 2004).

### **1.1.6b Postexpositionelle Prophylaxe (PEP)**

Die postexpositionelle Prophylaxe (PEP) sollte durchgeführt werden, wenn ein Verdacht oder eine erwiesene Exposition gegenüber Tollwutviren besteht. Die PEP beinhaltet eine Wundreinigung, gefolgt von aktiver und passiver Immunisierung (Tabelle 1.6) (CDC, 1999; WHO, 2004). Das Standardschema der aktiven Immunisierung besteht aus fünf Dosen, die intramuskulär an den Tagen 0, 3, 7, 14 und 28 verabreicht werden. Zwei alternative Schemata mit intradermal applizierten Impfstoffen werden derzeit in einigen Ländern als PEP verwendet. Sie gelten im Vergleich zu dem intramuskulären Schema als ökonomischer (Ambrozaitis, et al., 2006; Madhusudana, et al., 2006; Madhusudana, et al., 2004; Sehgal, et al., 1995; WHO, 2004).

Tabelle 1.5

*Präexpositionelle Tollwutimmunisierung (CDC, 1999).*

Risiko	Exposition	Betroffene Personen	Empfohlenes präexpositionelles Verfahren
Permanent	Häufiges Vorhandensein des Virus in hoher Konzentration. Oft unerkant (Kontakt mit oder ohne Biss, Aerosol)	Personal in Forschungs- und Produktionslaboratorien	Standardschema <sup>1</sup> . Bestimmung des Titers neutralisierender Antikörper alle 6 Monate. Booster bei Antikörpertiter unterhalb des ausreichenden Werts <sup>2</sup>
Häufig	Normalerweise sporadisch. Meist erkannt, auch unerkant (Kontakt mit oder ohne Biss, Aerosol)	Personal in Tollwutdiagnostiklaboratorien, Tierärzte, Waldarbeiter in tollwutenzootischen Gebieten	Standardschema <sup>1</sup> . Bestimmung des Titers neutralisierender Antikörper alle 2 Jahre. Booster bei Antikörpertiter unterhalb des ausreichenden Werts <sup>2</sup>
Gering	Fast immer sporadisch. Erkannt (Kontakt mit oder ohne Biss)	Tierärzte, Waldarbeiter in Gebieten mit niedriger Tollwutrate, Reisende in enzootischen Gebieten	Standardschema <sup>1</sup> . Keine Bestimmung des neutralisierenden Antikörpertiters, kein Booster
Selten	Immer sporadisch. Erkannt (Kontakt mit oder ohne Biss)	Übrige Bevölkerung	-

*Anmerkungen.* <sup>1</sup>Standardschema: drei Dosen intramuskulär oder intradermal an den Tagen 0 und 7, sowie entweder am Tag 21 oder 28. <sup>2</sup>Ausreichender Titer neutralisierender Antikörper:  $\geq 0,5$  IU/ml.

Die Entscheidung über eine PEP hängt von der Einschätzung des Infektionsrisikos eines Patienten ab. Diese wird durch die Umstände der Exposition, die möglichen übertragenden Säugetiere und die Resultate diagnostischer Tests

beeinflusst (Moore, et al., 2000). Basierend auf der Expositionsschwere unterscheidet die WHO (WHO, 2004) drei Grade (Tabelle 1.6).

Personen, die bereits eine präexpositionelle Immunisierung (Kapitel 1.1.6a) empfangen haben oder Personen mit ausreichendem neutralisierendem Antikörpertiter ( $\geq 0,5$  IU/ml) benötigen nur eine reduzierte PEP bestehend aus zwei Impfdosen, die intramuskulär oder intradermal an den Tagen 0 und 3 verabreicht werden.

Tabelle 1.6

*Grad der Tollwutexposition und empfohlene postexpositionelle Prophylaxe nach WHO.*

<b>Grad der Exposition</b>	<b>Art des Kontakts mit einem tollwutverdächtigen oder tollwütigen Haus- oder Wildtier</b>	<b>Art der Exposition</b>	<b>Empfohlene postexpositionelle Prophylaxe</b>
I	Berühren / Füttern von Tieren Belecken der intakten Haut	Keine	Keine Impfung
II	Knabbern an der intakten Haut nicht blutende Kratzer	Gering	Impfung Stopp der Behandlung, wenn das verdächtige Tier während einer Beobachtungsperiode von 10 Tagen gesund bleibt (Hund und Katze) oder wenn das Tier negativ auf Tollwut getestet wird
III	Einzelne oder mehrfache transdermale Bisse oder Kratzer, lecken auf beschädigter Haut Schleimhautkontamination mit Speichel (lecken) Exposition zu Fledermäusen	Schwer	Passive Immunisierung mit Immunglobulinen gegen Tollwutvirus und aktive Impfung Stopp der Behandlung, wenn das verdächtige Tier während einer Beobachtungsperiode von 10 Tagen gesund bleibt (Hund und Katze) oder wenn das Tier negativ auf Tollwut getestet wird



### 1.1.7 Impfstoffe zur Anwendung beim Menschen

Zurzeit gibt es drei Typen von Tollwutimpfstoffen zur Anwendung beim Menschen, die sich im Substrat, das für die Virusvermehrung verwendet wird, unterscheiden: (i) Neuralgewebe-Impfstoffe, die aus infizierten Schaf- oder Mäusegehirngeweben gewonnen werden, (ii) Entenembryo-Impfstoffe, die über infizierte Entenembryonen gewonnen werden und (iii) Zellkulturimpfstoffe auf der Basis von Hühnerembryozellen, humanen diploiden Zellkulturen, Harnsternierenzellen und anderen Zelllinien (Meslin, et al., 1996; Prem Kumar, et al., 2005; WHO, 2005). Nach Virusvermehrung werden die gewonnenen Virussuspensionen inaktiviert und gereinigt. Zur Virusreinigung werden meist Filtrations- oder Zentrifugationsverfahren eingesetzt.

Tollwutvirusstämme, die zur Impfstoffproduktion verwendet werden, sind u.a. PV (Pasteur Virus), CVS (Challenge Virus Standard), PM (Pitman-Moore) und FluryLEP (low egg passage Flury Stamm), die alle zur Spezies Rabies Virus gehören (Kapitel 1.1.1a).

#### 1.1.7a Qualitätskontrolle bei Impfstoffen

Die zugelassenen Tollwutimpfstoffe werden unter Einsatz verschiedener Testverfahren während der Vakzineherstellung charakterisiert (Reinheit, Unschädlichkeit und Wirksamkeit), um Qualität und Sicherheit der Impfstoffe zu gewährleisten. Diese Verfahren schließen Kontrollen der Ausgangsstoffe (Substrate und eingesetzte Virussuspensionen für Virusvermehrung), des Produktionsprozesses und der abschließend gewonnenen Stocksuspensionen (Sterilität, Antigengehalt, Inhalt residualen Materials) ein (WHO, 2005).

Für die Evaluierung der Wirksamkeit eines inaktivierten Impfstoffs wird die Potenz mittels des NIH Tollwutvakzine-Potenz-Tests ermittelt (OIE, 2004; WHO, 2004). Der Test ist als NIH-Test bekannt, da er ursprünglich an den „National Institutes of Health“ entwickelt wurde (Wilbur und Aubert, 1996). Der Test bestimmt den vorbeugenden Schutzgrad gegen eine Challenge-Infektion mit Tollwutvirus in mit inaktivierten Tollwutimpfstoffen immunisierten Mäu-

sen. Die Standardmethode besteht aus einer intraperitonealen Immunisierung von Tiergruppen mit unterschiedlichen Verdünnungen eines Referenz- sowie des Test-Impfstoffs und nach einem definierten Zeitabschnitt einer intrazerebralen Challenge-Infektion mit Tollwutvirus. Die Auswertung erfolgt durch den zahlenmäßigen Vergleich der gegen Tollwut geschützten Tiere zwischen den Gruppen, die den Testimpfstoff bzw. den Referenzimpfstoff erhalten haben. Derzeit gibt es mehrere Varianten des Tests, die sich in der Anzahl von Versuchstieren, Impfungen und getesteten Verdünnungen der Impfstoffe unterscheiden (Bruckner, et al., 2003). Einige dieser Varianten sind in Tabelle 1.7 dargestellt.

Die minimale Potenz, die für Tollwutimpfstoffe zum Einsatz beim Menschen gefordert wird, beträgt 2,5 IU pro Einzeldosis (WHO, 2004; , 2005).

#### **1.1.7b Nebenwirkungen**

Mittels Zellkulturen gewonnene Tollwutimpfstoffe gelten als sicher und wirksam. Allerdings wurden sporadische Nebenwirkungen beschrieben (WHO, 2002; , 2003). Im Gegensatz dazu besitzen die aus Neuralgeweben stammenden Impfstoffe hohe Reaktogenität<sup>1</sup> und eine z.T. niedrige Immunogenität. Aus diesem Grund empfiehlt die WHO beim Menschen nur die Verwendung von Zellkultur- oder Embryoimpfstoffen (WHO, 2004). Vorhandene Impfstoffe werden meist gut toleriert und nachteilige Reaktionen nach der Immunisierung sind nicht weit verbreitet. Milde lokale Reaktionen wie Schmerz, Erythem und Schwellung oder Jucken an der Injektionsstelle sowie generalisierte Reaktionen wie Übelkeit, Kopf-, Bauch-, Muskelschmerzen und Schwindelgefühl können nach Impfung auftreten (Arora, et al., 2004; Dobardzic, et al., 2007; Dreesen, et al., 1989).

---

<sup>1</sup> Reaktogenität: Nebenwirkungen eines Impfstoffes, ausgelöst z.B. durch Lösungs- u. Konservierungsmittel, Nährmedien oder Bestandteile von Mikroorganismen, die zur Herstellung des Impfstoffes verarbeitet wurden; in Frage kommen entzündliche u. allergisch-toxische Krankheitsbilder.

In seltenen Fällen treten allergische Reaktionen gegen Impfstoffbestandteile wie Tierproteine, Antibiotika, Konservierungsmittel oder Stabilisatoren auf (Georgitis und Fasano, 2001; Madaan und Maddox, 2003; Piyasirisilp und Hemachudha, 2002). Überempfindlichkeitsreaktionen und neurologische Erkrankungen, ähnlich dem Guillain-Barré Syndrom oder der multiplen Sklerose, sind in Verbindung mit einigen Tollwutimpfstoffen gemeldet worden (CDC, 1984; Dobardzic, et al., 2007; Dreesen, et al., 1986; Piyasirisilp und Hemachudha, 2002).

Tabelle 1.7

*Potenz-Test für inaktivierte Tollwutvakzinen: NIH-Test und seine Varianten (Bruckner et al., 2003).*

Vorge-schriebene Test-zahl	Eigen-schaften Versuchstier (Maus) (Gewicht / Alter)	Tierzahl je Verdünnung	Anzahl von Verdünnungen	Anzahl von Immunisierungen <sup>a</sup>	Abstand zwischen Immunisierungen (in Tagen)	Abstand zwischen Immunisierung (I) und Challenge-Infektion	Dosis der Challenge-Infektion (LD50) <sup>b</sup>	Beobachtungsperiode nach Challenge-Infektion (in Tagen)	Auswertungskriterien
WHO	2	13-16 g	≥ 16	2	7	14 Tage nach der ersten I	12 ≤ 25 ≤ 50	> 5-14	Tod
OIE	-	3-4 Wochen	≥ 10	n.s.	ggf. 7	14 Tage nach I	≥ 10	n.s.	n.s.
Ph.Eur. zur Anwendung beim Menschen	-	weiblich ± 4 Wochen 11-15 g	passend <sup>c</sup>	3	7	7 Tage nach der zweiten I	~ 50	5-14	Tod oder Anzeichen einer Tollwut-Erkrankung
Ph.Eur. zur Anwendung bei Tieren	-	weiblich ± 4 Wochen	≥ 10	≥ 3	n.a.	14 Tage	~ 50	5-14	Anzeichen einer Tollwut-Erkrankung

*Anmerkungen.* <sup>a</sup> Injektionsweg: intraperitoneal; Immunisierungsvolumen: 0,5ml.

<sup>b</sup> Challenge-Virus: CVS27; Challenge-Injektionsweg: intrazerebral; Injektionsvolumen: 0,03ml.

<sup>c</sup> Um die statistischen Anforderungen für einen gültigen Test zu erfüllen, muss eine passende Anzahl von Tieren verwendet werden.

n.s.: nicht spezifiziert; ggf.: gegebenenfalls; n.a.: nicht applizierbar

NIH: National Institutes of Health; WHO: World Health Organization; OIE: Office International des Epizooties; Ph.Eur.: European Pharmacopoeia.

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

Zwei für die Tollwutprophylaxe des Menschen zugelassene Impfstoffe sind „Rabipur“ und „Rabivac“. Beide Vakzinen sind sicher und effektiv zur Verhinderung einer Tollwuterkrankung (Dobardzic, et al., 2007; Dreesen, 1997; Vodopija, et al., 1999). Die Vakzinen enthalten jeweils inaktivierte Viruspartikel eines Tollwutvirusstammes, FluryLEP („Rabipur“) bzw. PM 1503 („Rabivac“). Als Wirtssysteme zur Vermehrung der entsprechenden Virusstämme werden Hühnerembryozellen bzw. humane diploide Zellkulturen verwendet. Um Qualität und Sicherheit der Vakzinen zu gewährleisten, wird der Produktionsprozess von Anfang bis Ende mit Hilfe verschiedener Testverfahren überprüft. Es fehlen jedoch zusätzliche Informationen bezüglich einiger Aspekte, die die Qualitätskontrolle der Impfstoffherstellung ergänzen können. Diese Aspekte schließen die genetische Identität der Virusstämme im Vergleich zu anderen Impfstämmen und die Analyse biochemischer Merkmale wie Zusammensetzung der Vakzine-Proteome ein.

Nach einer Immunisierung können Nebenwirkungen in Form von lokalen sowie systemischen Reaktionen vorkommen. Auch allergische Reaktionen gegen Impfstoffbestandteile sind möglich. Im Fall der genannten Vakzinen wurden in klinischen Studien geringgradige unerwünschte lokale und systemische Reaktionen wie Schmerzen, Urtikaria und Erythema an der Injektionsstelle sowie Kopfschmerzen, Fieber, Myalgien, Übelkeit und grippeähnliche Symptome gemeldet (Arora, et al., 2004; Dobardzic, et al., 2007; Dreesen, et al., 1989). In seltenen Fällen traten gravierende Nebenwirkungen wie allergische Reaktionen und neurologische Erkrankungen auf (Dobardzic, et al., 2007; Piyasirisilp und Hemachudha, 2002).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare und biochemische Charakterisierung der o.a. Impfstoffe. Vergleichende Genom-Analysen sollten die genomische Identität der beiden Virusstämme und die Verwandtschaft zu anderen Impfstämmen aufklären. Die Proteom-Analyse sollte Information über

die enthaltenen Proteine (virale und nicht virale Proteine) in den Vakzinepräparationen liefern.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Etablierung von ELISA-Systemen für die Quantifizierung des Tollwutvirusglykoproteins sowie des Tollwutvirusnukleoproteins. Mit Hilfe dieser Verfahren soll die Entwicklung eines in-vitro-Tests zur Bestimmung der Potenz von Impfstoffen gegen Tollwut vorangetrieben werden. Bisher wird die Potenz der Tollwutimpfstoffpräparationen durch den NIH-Test bestimmt, der an Mäusen durchgeführt wird (Kapitel 1.1.7a). Dieser Test ist aufwendig, zeitraubend und weist eine hohe Variabilität auf. Die Entwicklung eines in-vitro-Potenz-Tests bietet die Basis zur Reduzierung und längerfristig zum Ersatz von Tierversuchen. Reproduzierbarkeit und schnelle Gewinnung von Resultaten sind weitere Vorteile eines in-vitro-Testverfahrens.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Biologisches Material

##### 2.1.1a Versuchstiere

Zur Herstellung polyklonaler Seren wurden Chinchilla-Kaninchen verwendet. Diese Tiere wurden von Chiron Vaccines bezogen und im Tierstall des Instituts für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten.

##### 2.1.1b Zellkulturen

Kulturzellen:

###### BHK-21 Zellen

Bei BHK (Baby Hamster Kidney) Zellen handelt es sich um eine adhärenzte Zelllinie. Die Zellen werden bei einer Temperatur von 37°C propagiert.

ATCC: CCL-10. Quelle: AFSSA Nancy.

###### SF-21 Zellen

Bei SF-21 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie des ovariellen Gewebes der *Spodoptera frugiperda* Larven. Die Zellen zeigen ein optimales Wachstum bei einer Temperatur von 27°C und können sowohl in Suspension als auch in adhärenzter Kultur gehalten werden. Diese Insektenzellen wurden für die Produktion rekombinanter Proteine im Baculovirus-Expression-System verwendet.

Bakterien:

Bakterienstamm JM109

Bei den Bakterien JM109 handelt es sich um Zellen aus dem Escherichia-coli-Stamm JM109. Diese Zellen besitzen wegen einer Deletion ihres lacZ-Gens keine eigene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. JM109 Bakterien werden zur Transformation rekombinanter Plamide verwendet. Zellen bzw. Kolonien, die bei der Transformation ein Plasmid erhalten haben, werden über die Expression des nach Insertion komplementierten lacZ-Gens (Blau-Weiß-Selektion) oder über eine Antibiotikaresistenz (Ampicillinresistenz) selektiert.

### **2.1.1c Viren**

Tollwutvirus:

Stamm FluryLEP: erhalten von Chiron Vaccines (Novartis Behring).

Stamm PM 1503: erhalten von Chiron Vaccines (Novartis Behring).

Stamm CVS: erhalten von Dr. M. König, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen. ATCC: VR 959. Quelle: AFSSA Nancy.

Rekombinante Baculoviren AcMNPV (Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus):

Die rekombinanten Viren Bac.FL-NP, Bac.FL-GP und Bac.PM-NP wurden von Dr. I. Stallkamp zur Verfügung gestellt.

Die rekombinanten Bac.PM-GP, Bac.PM-GPs und Bac.FL-GPs wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

### **2.1.2 Vakzinen**

Tollwutvakzine „Rabipur“ (Fa. Chiron Vaccines).

Die Vakzine Rabipur beinhaltet den Tollwutvirusstamm FluryLEP.



Zur Vermehrung des Virus werden Hühnerembryozellen als Wirtssystem verwendet.

Tollwutvakzine „Rabivac“ (Fa. Chiron Vaccines)

Die Vakzine Rabivac beinhaltet den Tollwutvirusstamm PM 1503. Humane diploide Zellkulturen (MRC-5 Zellen) werden als Wirtssystem zur Virusvermehrung verwendet.

Zur Virusvermehrung beider Vakzinen wird das Kulturmedium (Eagle's minimum essential medium) mit humanem Albumin angereichert. Die gewonnenen Virussuspensionen werden unter Einsatz von  $\beta$ -Propiolacton inaktiviert und durch Zonenzentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten gereinigt. Inaktiviertes und gereinigtes Virus für die Vakzinepräparation wird in dieser Arbeit als „Viruskonzentrat“ bezeichnet. Die Einstellung der Vakzinedosis erfolgt anhand der Menge des mittels ELISA bestimmten Tollwutvirusglykoproteins sowie der mittels des NIH-Tests (Kapitel 1.1.7a) ermittelten Potenz der entsprechenden Viruskonzentrate. Schließlich wird Polygelin (Haemaccel<sup>®</sup>) als Stabilisator zugegeben und die Vakzinen abschließend lyophilisiert (Abbildung 2.1).

### 2.1.3 Medien und Platten

#### 2.1.3a Medien für Zellkultur

Medium für BHK Zellen: DMEM with Glutamine (0,75 mg/ml) (Fa. Gibco, Invitrogen)

Mit 10 % FBS und Penicillin (100 IU/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) supplementiert.

Medium für SF-21 Zellen: SF-900 II Medium with L-Glutamine (Fa. Invitrogen)

Mit Penicillin (100 IU/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) und Amphotericin (2,5  $\mu$ g/ml) supplementiert.

Medium für SF-21 Zellen – Plaquetest: SF-900 Medium 1,3x (Fa. Invitrogen)

Einfriermedium:	Medium für BHK oder SF-21 Zellen	70 % (v/v)
	FBS	20 % (v/v)
	DMSO	10 % (v/v)

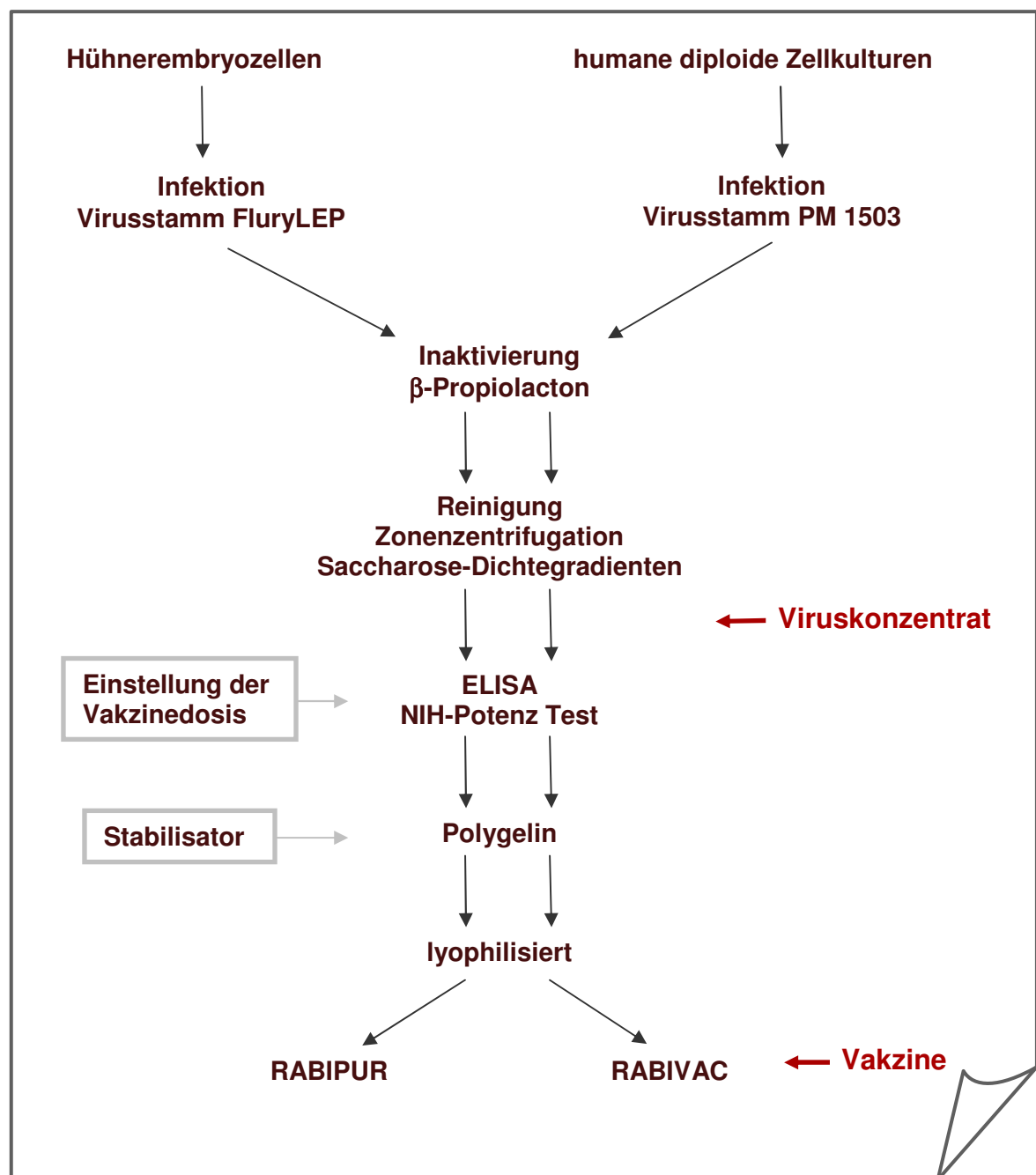


Abbildung 2.1. Fließschema zur Herstellung der Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“.

**2.1.3b Medien und Platten für die Kultivierung von Bakterien**

LB-Medium:                    1 % (w/v) Tryptone (Bacto)  
                                     0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Bacto Yeast)  
                                     171 mM NaCl  
                                     ad 1 L ddH<sub>2</sub>O  
                                     autoklaviert und bei 4°C gelagert

LB-Agarplatten:                LB-Medium  
                                     1,5 % (w/v) Agar  
                                     75 µg/ml Ampicillin

SOC-Medium:                 2 % (w/v) Casein-Hydrolysat (Bacto Tryptone)  
                                     0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Bacto Yeast)  
                                     10 mM NaCl  
                                     2,5 mM KCl  
                                     10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                     10 mM MgSO<sub>4</sub>  
                                     20 mM Glucose  
                                     ad 1 L ddH<sub>2</sub>O  
                                     autoklaviert und bei 4°C gelagert

**2.1.4 Zusätze für Medien und Agarplatten**

Penicillin/Streptomycin 500x:                50000 UI/ml Penicillin G  
    50 mg/ml Streptomycinsulfat  
    in ddH<sub>2</sub>O gelöst, sterilfiltriert, bei -20°C aufbewahrt

Amphotericin 500x:            1,25 mg/ml  
    in ddH<sub>2</sub>O gelöst, sterilfiltriert, bei -20°C aufbewahrt

Foetales bovines Serum (FBS): Fa. PAA

X-Gal-Lösung: 40 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)  
in DMF (Dimethylformamid) gelöst, bei -20°C gelagert

LMP-Agarose: 1,5 % LMP-Agarose (low melting point)  
in ddH<sub>2</sub>O eingesetzt, autoklaviert, bei RT gelagert

### 2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Fa. Fluka
Acrylamid	Fa. Fluka
Agarose (Elektrophorese)	Fa. Difco
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Fa. Serva
Ampicillin	Fa. Roth
BSA	Fa. Serva
CHAPS	Fa. Fluka
Coomassie Blue R-250	Fa. Merck
Dimethyl-Pimelinediimidat-Dihydrochlorid (DMP)	Fa. Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Serva
EDTA (ethylendiamin-tetraacetat)	Fa. Merck
EDTA-Na <sub>2</sub> (Dinatrium-Ethylendiamin-Tetraacetat-Dihydrat)	Fa. Merck
Essigsäure	Fa. Roth
Ethanol	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Roth
Freunds Adjuvans	Fa. Sigma
Glycerin	Fa. Sigma-Aldrich
Glycin	Fa. Roth
Formaldehyd	Fa. Merck
Harnstoff	Fa. Merck
IPG Buffer pH 4-7 / pH 3-10	Fa. Amersham Biosciences

Isopropanol	Fa. Roth
LMP-Agarose	Fa. Invitrogen
Methanol	Fa. Fluka
Methylaminwolframat	Fa. Plano Marburg
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Fa. Merk
Nonylphenyl-Polyethylenglycol (NP-40)	Fa. Fluka
Paraformaldehyd	Fa. Fluka
Penicillin	Fa. Sigma-Aldrich
Peroxidase-conjugated Streptavidin	Fa. Dianova
Protease Inhibitor Cocktail	Fa. Sigma-Aldrich
SDS	Fa. ICN
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Fa. Invitrogen
SequaGel® XR	Fa. National Diagnostics
SequaGel® Complete Buffer	Fa. National Diagnostics
Streptomycin	Fa. Sigma-Aldrich
TEMED	Fa. Boehringer Mannheim
Triton X-100	Fa. Fluka
Trizma Base	Fa. Merk
Tween 20	Fa. Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Fa. ICN

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

#### 2.1.6a Häufig verwendete Puffer

PBS:	171 mM NaCl
	3,35 mM KCl
	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	1,84 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	ad 1 L ddH <sub>2</sub> O

Ca/Mg-Lösung 10x:      10,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                 6,8 mM CaCl<sub>2</sub>  
                                 ad 1 L ddH<sub>2</sub>O

PBS<sup>++</sup>:                900 ml PBS  
                             100 ml Ca/Mg-Lösung 10x

Trypsin-Lösung:      2,5 g Trypsin, 1:250 (Fa. Sigma)  
                             3,3 mM (1,23g) EDTA  
                             0,016 g Phenolrot  
                             ad 1 L PBS  
                             sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

Trypanblau-Lösung: 0,25 % (w/v) Trypanblau (Serva 37252)  
                             150 mM NaCl  
                             in ddH<sub>2</sub>O gelöst, filtriert, bei 4°C gelagert

ABDB-A Puffer:      1 % (w/v) BSA  
                             0,05 % (v/v) Tween 20  
                             0,01 % NaN<sub>3</sub>  
                             in TBS (50 mM Tris, 0,85 % (w/v) NaCl, pH 7,6)  
                             bei 4°C gelagert

### **2.1.6b Puffer für RT-PCR**

2,5x RT Puffer (VIII A):    125 mM Tris-HCl, pH 8,3  
                                     187,5 mM KCl  
                                     7,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                     25 mM Dithiothreitol (DTT)  
                                     je 1,25 mM dATP / dCTP / dGTP / dTTP  
                                     in ddH<sub>2</sub>O für PCR gelöst, bei -20°C gelagert

5x PCR Puffer (VIII B): 25 mM Tris-HCl, pH 8,3  
100 mM KCl  
6,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 % (v/v) Triton X-100  
0,1 % (w/v) BSA  
je 1,25 mM dATP / dCTP / dGTP / dTTP  
in ddH<sub>2</sub>O für PCR gelöst, bei -20°C gelagert

TAE Puffer: 40 mM Tris  
5 mM Na-Acetat  
5 mM EDTA  
pH 7,8, in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei RT gelagert

DNS-Auftragspuffer: 0,1 % (w/v) Orange G  
5,0 % (w/v) Ficoll 400  
in 5x TAE Puffer

Agarosegellösung: 1,5 % (w/v) Agarose  
in TAE Puffer gelöst

### 2.1.6c Puffer für Sequenzierung

Stopplösung für Sequenzreaktionen: 1 ml „Loading dry fluorescent samples“  
Puffer (Amersham Biosciences)  
150 µl 0,1 % (w/v) Bromophenolblau

10x LongRun buffer: 0,5 M Tris  
0,5 M Borsäure  
20 mM EDTA  
in ddH<sub>2</sub>O gelöst  
pH 7,6, bei RT gelagert

4 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel (Sequagel XR, Fa. National Diagnostics):

25,6 ml Sequagel XR (6 %)  
6,4 ml Sequagel complete Buffer reagent  
6,4 g Harnstoff  
1,6 ml 10x LongRun buffer  
12 ml ddH<sub>2</sub>O  
320 µl 10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat)  
16 µl TEMED  
filtriert

#### **2.1.6d Puffer für SDS-PAGE**

##### **2.1.6da Eindimensionale Gelelektrophorese (1-D SDS-PAGE)**

4xVD-Proteinauftragepuffer: 250 mM Tris-HCl, pH 6,8

6 M Harnstoff

40 % (v/v) Glycerin

8 % (w/v) SDS

0,004 % (w/v) Bromophenolblau

0,004 % (w/v) Phenolrot

filtriert, bei -20°C gelagert

Für reduzierende Bedingungen, Zugabe von 10 mM DTT

Gelpuffer 3x:

3 M Tris-HCl, pH 8,5

0,3 % (w/v) SDS

in ddH<sub>2</sub>O gelöst, filtriert, bei RT gelagert

Kathodenpuffer 10x:

1 M Tris-HCl, pH 8,25

1 M Tricin

1 % (w/v) SDS

in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei RT gelagert



Anodenpuffer 10x:        2 M Tris-HCl, pH 8,9  
                                 in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei RT gelagert

### 2.1.6db Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D SDS-PAGE)

Lysis buffer: 8 M Harnstoff  
                 4 % (w/v) CHAPS  
                 2 % (v/v) Pharmalyte (pH 4-7 / 3-10)  
                 in ddH<sub>2</sub>O gelöst, filtriert, bei -20°C gelagert

Rehydration buffer: 8 M Harnstoff  
                         2 % (w/v) CHAPS  
                         0,002 % (w/v) Bromophenolblau (1 % Stock-Lösung in  
                         50 mM Tris-base angesetzt)  
                         in ddH<sub>2</sub>O gelöst, filtriert, bei -20°C gelagert

Vor Benutzung erfolgte die Zugabe von:    0,5 % Pharmalyte (pH 4-7 / 3-10)  
   10-20 mM DTT

SDS equilibration buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,8  
                                 6 M Harnstoff  
                                 30 % (v/v) Glycerol (87 % v/v)  
                                 2 % (w/v) SDS  
                                 0,002 % (w/v) Bromophenolblau (1 % Stock-Lösung  
                                 in 50 mM Tris-base angesetzt)  
                                 in ddH<sub>2</sub>O gelöst, filtriert, bei -20°C gelagert

Vor Benutzung erfolgte die Zugabe von DTT oder Iodoacetamide

Resolving gel buffer 4x:    1,5 M Tris-HCl, pH 8,8  
                                 in ddH<sub>2</sub>O gelöst, filtriert, bei 4°C gelagert

SDS electrophoresis buffer: 25 mM Tris-base  
192 mM Glycine  
0,1 % (w/v) SDS  
pH 8,3 (muss nicht eingestellt werden)  
in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei RT gelagert

Agarose sealing solution: 0,5 % (w/v) Agarose (NA oder M)  
0,002 % (w/v) Bromophenolblau (1 % Stock-  
Lösung in 50 mM Tris-base angesetzt)  
in SDS electrophoresis buffer gelöst, bei RT gelagert

### **2.1.6e Puffer für Protein-Transfer auf Membran**

#### **2.1.6ea Semi-Dry Transfer**

SD-Blotpuffer: 25 mM Tris-base  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol  
pH 8,3 (muss nicht eingestellt werden)  
in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei 4°C gelagert

#### **2.1.6eb Nasstransfer**

WB-Puffer nach BJERRUM 10x: 480 mM Tris-base  
390 mM Glycin  
pH-Wert liegt bei über pH 9,0 (muss nicht eingestellt werden)  
in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei RT gelagert  
Als 1x Puffer wurde mit 20 % (v/v) Methanol eingesetzt

WB\_C-Puffer 10x: 100 mM CAPS, pH 11  
in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei RT gelagert  
Als 1x Puffer wurde mit 10 % (v/v) Methanol eingesetzt

### 2.1.6f Lösungen für Protein-Färbung

#### 2.1.6fa Coomassie-Färbung

Fixierlösung: 0,1 % (w/v) Coomassie Blue R-250  
1 % (v/v) Essigsäure  
40 % (v/v) Methanol  
in ddH<sub>2</sub>O, bei RT gelagert

Entfärberlösung: 50 % (v/v) Methanol  
in ddH<sub>2</sub>O, bei RT gelagert

#### 2.1.6fb Silberfärbung (Blum, et al., 1987)

Fixierlösung: 50 % (v/v) Methanol  
12 % (v/v) Essigsäure  
in ddH<sub>2</sub>O, bei RT gelagert  
Direkt vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 0,05 % (v/v) Formaldehyd

Thiosulfatlösung: 0,02 % (w/v) Natrium Thiosulfat  
in ddH<sub>2</sub>O, bei RT gelagert

Imprägnierlösung: 0,2 % (w/v) Silber Nitrat  
in ddH<sub>2</sub>O, frisch eingesetzt  
Direkt vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 0,05 % (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung: 6 % (w/v) Natrium Carbonat  
2 % (v/v) Thiosulfatlösung  
in ddH<sub>2</sub>O, bei RT gelagert  
Direkt vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 0,05 % (v/v) Formaldehyd

Stopplösung: 50 mM EDTA- $\text{Na}_2$  (Dinatrium-Ethylendiamin-Tetraacetat Dihydrat)  
in ddH<sub>2</sub>O, bei RT gelagert

#### **2.1.6g Puffer für die Reinigung der rekombinanten Proteine**

LP-N Puffer: 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
0,6 M NaCl  
20 % (v/v) Glycerol  
10 mM Imidazole  
1 % (v/v) NP-40  
0,5 % (v/v) Protease inhibitor Cocktail  
pH 7,5, bei 4°C gelagert

WP-N Puffer: 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
0,6 M NaCl  
20 % (v/v) Glycerol  
10 mM Imidazol  
pH 7,5, bei 4°C gelagert

EP-N Puffer: WP-N Puffer  
250 mM Imidazol  
Bei 4°C gelagert

ConA-WP Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,4  
0,5 M NaCl  
bei RT gelagert

ConA-EP Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,4  
0,5 M NaCl  
0,1 - 0,5 M Methylmannopyranosid  
bei RT gelagert

IAC-WP Puffer: 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
pH 7,2, bei RT gelagert

IAC-EP Puffer: 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
3,5 M  $\text{MgCl}_2$   
pH 7,2, bei RT gelagert

LPG\_SDS Puffer: 50 mM Tris-HCl  
0,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
5 mM KCl  
137 mM NaCl  
0,5 % (w/v) SDS  
0,5 % (v/v) Protease inhibitor Cocktail  
pH 7,5, bei 4°C gelagert

### 2.1.6h Puffer für Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Sepharose G

Puffer I: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0  
in ddH<sub>2</sub>O  
filtriert, bei RT gelagert

Puffer II: 0,2 M Na-Tetraborat, pH 9,0  
in ddH<sub>2</sub>O, filtriert, bei RT gelagert

DMP Puffer: 20 mM Dimethyl pimelinediimide dihydrochloride  
in Puffer II (pH 8,8), frisch angesetzt

Puffer III: 0,2 M Triethanolamin, pH 8,0  
in ddH<sub>2</sub>O, filtriert, bei RT gelagert

**2.1.6i Puffer für die Reinigung der Antikörper**

Na-P-Puffer: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0  
in ddH<sub>2</sub>O, filtriert, bei RT gelagert

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin, pH 2,5  
in ddH<sub>2</sub>O, filtriert, bei RT gelagert

**2.1.6j Puffer für die Biotinylierung von polyklonalen Antikörpern**

Biotin-Lösung: 12,5 mg/ml D-Biotin-N-Hydroxysuccinimide ester (Fa. Roche)  
in DMF (Dimethylformamid) gelöst, bei -20°C gelagert

B-Puffer: 0,1 M Na-Borat, pH 8,8  
filtriert, bei RT gelagert

**2.1.6k Puffer für ELISA**

ELISA-Waschpuffer: 0,05 % (v/v) Tween 20  
in PBS<sup>++</sup>, bei RT gelagert

ELISA-Blockpuffer: 1 % (w/v) BSA  
in ELISA Waschpuffer gelöst, frisch eingesetzt

ELISA-Substratpuffer: 100 mM Citronensäure  
in 20 mg/ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  gelöst und bei pH 4,0 eingestellt  
bei 4°C gelagert

Direkt vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 0,05 % (w/v) ABTS und  
0,03 % (v/v) Wasserstoff-Peroxid (30 %)

ELISA-Stopplösung: 1 % (w/v) SDS  
in ddH<sub>2</sub>O, bei RT gelagert

### 2.1.7 Antikörper

Primärantikörper

Bezeichnung	Typ	Zielantigen	Quelle/Firma
TW-17	monoklonal (Maus)	Tollwutvirus - Glykoprotein	Chiron Vaccines
Anti- Rabipur	polyklonal (Kaninchen)	Tollwutvirus	Chiron Vaccines
Anti- Rabivac	polyklonal (Kaninchen)	Tollwutvirus	Chiron Vaccines
M2D4_c	polyklonal (Kaninchen)	Tollwutvirus - Matrixprotein	Dr. K. K. Conzelmann, Dr. Stefan Finke
94.4	polyklonal (Kaninchen)	Tollwutvirus - Largeprotein	Dr. K. K. Conzelmann, Dr. Stefan Finke
Penta-His	monoklonal (Maus)	Histidin-tag	Qiagen
Anti- Albumin	polyklonal (Kaninchen)	Albumin	Institut für Biochemie, Jus- tus-Liebig Universität Gies- sen
Anti-Human Haptoglobin	polyklonal (Kaninchen)	Haptoglobin	Sigma-Aldrich
Centocore FITC- markiert	monoklonal (Maus)	Tollwutvirus - Nuk- leoprotein	Microtest

## Sekundärantikörper

Antikörper	Markierung	Firma
Ziege anti-Maus IgG	Peroxidase	Dianova
	Cy3	Dianova
	10 nm colloidales Gold	BB INTERNATIONAL
Ziege anti-Kaninchen IgG	Peroxidase	Dianova
	Cy3	Dianova
	10 nm colloidales Gold	BB INTERNATIONAL

## 2.1.8 Fertige Reagenzien und Kits

RNeasy® RNA Preparations Kit	Fa. Qiagen
DNeasy® DNA Preparations Kit	Fa. Qiagen
QIAEX® II, DNA Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen
TOPO TA Cloning Kit	Fa. Invitrogen
QIAprep® Miniprep Kit	Fa. Qiagen
Termo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit	Fa. Amersham Biosciences
pBlueBac4.5/V5-His Baculovirus Transfer Vector	Fa. Invitrogen
Bac-N-Blue™ Transfection Kit	Fa. Invitrogen
pFastBac HTb Expression Vector	Fa. GIBCO BRL
BC Assay: Protein Quantification Kit	Fa. Uptima
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Fa. PerkinElmerLife Sciences

## 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Plastikreaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Handschuhe Rotiprotect® LATEX / NITRIL	Fa. Roth



Sterilfilter	Fa. Fisher
Mikrozentrifugenfilter	Fa. Millipore
Nitrocellulosemembran	Fa. Schleicher und Schuell
PVDF-Membran	Fa. Millipore
Filterpapier	Fa. Roth
Biomax™ Röntgenfilme	Fa. Kodak
TALON® CellThru resin	Fa. BD Biosciences
Con A Sepharose 4B	Fa. Amersham Biosciences
Protein G Sepharose® 4 Fast Flow	Fa. Amersham Biosciences
HiTrap™ Protein-G HP affinity columns (1 ml)	Fa. Amersham Biosciences
Immobiline DryStrip 13 cm pH 4-7 / pH 3-10	Fa. Amersham Biosciences

### 2.1.10 Geräte

Analysenwaage	Fa. Sartorius
Automatikpipetten	Fa. Biohit
Blot-Kammer (Nass-Blot)	Fa. BioRad
Brutschränke	Fa. Forma Scientific
Centrilutor®	Fa. Amicon®
DNA-Sequenzierautomat LICOR 4000	Fa. Licor
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Fa. BioRad
Elektrophoresekammer Hoefer SE600 (Polyacrylamidgele)	Fa. Amersham Biosciences
Heizblock	Fa. Eppendorf
Heizwasserbad	Fa. Memmert
IPGphor (first dimension equipment)	Fa. Amersham Biosciences
Kühl- und Gefrierschränke	Fa. Liebherr
Kühlwasserbad	Fa. Lamda
Magnetrührer	Fa. IKAMAG® REO
Mehrkanalpipetten	Fa. Micronic® System
Mikroliterpipetten	Fa. Gilson
Mikrowellenherd	Fa. Sanyo

## Mikroskope:

Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axiovert und Filtermodule	Fa. Zeiss
Invertmikroskop	Fa. Zeiss
Transmissionselektronenmikroskop EM 910	Fa. Zeiss
pH-Meter	Fa. Knick
RNA/DNA calculator – GeneQuant II	Fa. Pharmacia Biotech
Schüttler	Fa. Technomara
Semi-dry Blot-Apparatur	Fa. BioRad
Sicherheitswerkbank Klasse II	Fa. Clean Air
ELISA-Reader SLT spectra	Fa. Tecan
Thermocycler	Fa. Perkin Elmer
Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf
Tiefkühlschränke	Fa. Liebherr
Vortex-Gerät	Fa. IKA
Waage	Fa. Mettler Toledo
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Fa. Fisher Scientific
Zentrifugen	
Tischzentrifugen	Fa. Heraeus
Zentrifugen / Rotoren	Fa. Sorvall, Fa. Beckmann

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1a Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

##### 2.2.1aa RNS Isolierung aus Kulturzellen

Zur Isolierung der Gesamt-RNS wurde das RNeasy® Kit (Fa. Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. BHK-21 Zellen wurden mit Tollwutvirus infiziert. Nach 2-3 Tagen Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit RNS-Lysispuffer lysiert. Das Zell-Lysat wurde auf eine QIAshredder Säule gegeben und bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde nach Zugabe von 350 µl 70 %-igem Ethanol auf eine RNeasy Minisäule überführt und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Nach Waschung der Säule (einmal mit Waschpuffer RW1 und zweimal mit Waschpuffer RPE) erfolgte die Elution der RNS durch Zugabe von 40 µl Elutionspuffer AVE und Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

##### 2.2.1ab Reverse Transkription

Zur Durchführung einer RT-PCR wurde zuerst der folgende Ansatz für 3 min bei 94°C denaturiert (Bindung des ersten Primers) und dann auf 4°C abgekühlt:

Startmix je Reaktionsansatz: 0,2 µl RNS (entspricht 1-2 µg Gesamtzellen-RNS)  
0,2 µl reverser Primer (100 pmol/µl)  
8,6 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O

Nach Zugabe eines RT-Mixes zu den Proben folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C (reverse Transkription). Anschließend wurde die reverse Transkriptase für 2 min bei 94°C denaturiert und die Proben auf 4°C abgekühlt.

RT-Mix je Reaktionsansatz: 8,0 µl Puffer VIIIA  
0,25 µl Ribonuklease Inhibitor (RNaseOUT,  
Fa. Gibco)  
0,25 µl Reverse Transkriptase (Superscript II RT,  
Fa. Invitrogen)

### **2.2.1.ac Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Nach der reversen Transkription folgte die Zugabe eines PCR-Mixes und eine Inkubation von 30 Zyklen aus Denaturierung (94°C, 30 sec), Annealing (55°C, 30 sec) und Elongation (72°C, 30 sec). Nach einer abschließenden Elongation bei 72°C für 5 min wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

PCR-Mix je Reaktionsansatz: 10,0 µl Puffer VIIIB  
0,2 µl forward Primer (100 pmol/µl)  
0,2 µl Polymerase (Taq-Polymerase, Fa. Gibco)  
19,6 µl ddH<sub>2</sub>O

Die PCR Produkte wurden direkt auf einem 1,5 %-igen (w/v) Agarosegel zur Analyse aufgetrennt oder bei -20°C gelagert.

### **2.2.1b PCR-Analyse von Baculoviren**

Trotz der Verwendung von linearisierter Virus-DNS lässt sich die Co-Transfektion von Wildtyp-DNS nicht völlig vermeiden. Aus diesem Grund mussten die rekombinanten Baculoviren mittels eines Plaque-Tests (Kapitel 2.2.2f) gereinigt und durch eine PCR identifiziert werden.

#### **2.2.1ba DNS-Isolierung aus Virussuspensionen**

Zur Isolierung der DNS wurde das DNeasy® Kit (Fa. Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Zu 200 µl Baculovirussuspension wurden 20 µl Pro-

teinase K und 200 µl Puffer AL gegeben, gemixt und bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 100 %-igem Ethanol wurde die Mischung auf eine DNeasy Minisäule gegeben und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Dann wurde die Säule mit 500 µl Waschpuffer AW1 und danach mit 500 µl Waschpuffer AW2 gewaschen. Um die DNS zu eluieren, erfolgte die Zugabe von 50 µl Elutionspuffer AE. Anschließend wurde die Säule für 5 min bei RT inkubiert und daraufhin bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert.

Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.1bb Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

PCR-Ansatz je Reaktionsansatz: 20,0 µl DNS  
5,0 µl PCR Puffer (10x Puffer, Fa. Biotherm™)  
1,0 µl dNTP-Mix (je 10 mM)  
2,0 µl Primer I (100 pmol/µl)  
2,0 µl Primer II (100 pmol/µl)  
1,5 µl Polymerase (Taq-Polymerase, Fa. Gibco)  
18,5 µl ddH<sub>2</sub>O

Die PCR wurde nach dem folgenden Programm durchgeführt:

Denaturierung:	94°C, 2 min
30 Zyklen	
Denaturierung	94°C, 1 min
Annealing	55°C, 2 min
Elongation	72°C, 3 min
Abschließende Elongation	72°C, 7 min

Die PCR Produkte wurden direkt auf einem Agarosegel zur Analyse aufgetrennt oder bei -20°C gelagert. Nur Virussuspensionen, die keine dem Wildtyp-

Virus entsprechende Bande aufwiesen, wurden zur Virusvermehrung bzw. Expression von Proteinen verwendet.

### **2.2.1c Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der amplifizierten DNS erfolgte in 1,5 %-igen Agarosegelen unter Zusatz von Ethidiumbromid in TAE-Puffer. Nach der Elektrophorese wurde die DNS unter UV-Licht sichtbar gemacht und bei Bedarf das gewünschte DNS-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Isolierung der DNS wurde mittels des QIAEX®II, DNA Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.1d Herstellung rekombinanter Baculovirus-Transferplasmide**

Zur heterologen Expression des Glykoproteins bzw. Nukleoproteins der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 wurde das Baculovirus-Expressionssystem ausgewählt. Es handelt sich um ein eukaryotisches Expressionssystem, in welchem die meisten posttranslationalen Modifikationen exprimierter Proteine durchgeführt werden. Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wird zunächst das heterologe Gen in einen Baculovirus-Transfervektor kloniert. Zu diesem Zweck wurde das gewünschte Gen ausgehend von der m-RNS mittels RT-PCR (s.o.) amplifiziert. Die verwendeten spezifischen Primer wurden entsprechend der publizierten Sequenz des Tollwutvirusstamms PV bzw. den ermittelten Sequenzen der Stämme FluryLEP und PM 1503 ausgewählt (Tabelle 2.1). Es wurde eine BamHI-Schnittstelle an den 5'-Terminus und eine HindIII-Schnittstelle an den 3'-Terminus des entsprechenden Gens eingefügt, um die Orientierung des Inserts nach Ligation in den Transfervektor pBlueBac4.5/V5-His sicher zu stellen.

Tabelle 2.1

*Primersequenzen zur Amplifizierung der cDNS des Tollwutvirus G-Proteins.*

zu amplifizierender Genombereich	Primer	Primersequenz
Glykoprotein Tollwutvirusstamm PM 1503	BamHI- G3sense	GACTTAGGATCCGATGGTGCCTCAGGTTCTTT
	HindIII- P-Grev	GGAAGCTTCAGTCTGATCTCGCCTCCA
Glykoprotein ohne zytoplasmatische und Transmembran- Regionen, Tollwutvirusstamm FluryLEP bzw. PM 1503	BamHI- Gssense	GACTTAGGATCCGATGGTGCCTC
	HindIII- Gsrev	TGCAATCATCAAAAGCTTCTTCCC

*Anmerkungen.* Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung aufgelistet.

Ein Restriktionsverdau des Inserts bzw. des Vektors mit den beschriebenen Enzymen wurde durchgeführt, resultierende Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten (s.o.).

Zur Ligation wurden der isolierte Vektor und das Insert im Verhältnis 1:3 gemischt und über Nacht bei 16°C mit T4-DNA-Ligase (Fa.TaKaRa) inkubiert.

Ligationsansatz:	1:3 Vektor: Insert
	1,0 µl 10x Ligase Puffer (Fa.TaKaRa)
	0,5 µl T4-DNA-Ligase (350 U/µl, Fa. TaKaRa)
	ddH <sub>2</sub> O ad 10 µl
Negativkontrolle:	1:3 Vektor: ddH <sub>2</sub> O
	1,0 µl 10x Ligase Puffer (Fa.TaKaRa)
	0,5 µl T4-DNA-Ligase (350 U/µl, Fa. TaKaRa)
	ddH <sub>2</sub> O ad 10 µl

Für die Transformation wurden kompetente E. coli JM109 Bakterien verwendet. 100 µl JM109 Suspensionen wurden mit dem Ligationsansatz gemischt und für

30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min. Danach wurden die Zellen für 5 min wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl SOC Medium erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h unter Schütteln. Anschließend wurden 200 µl der Probe auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden einige Klone mit einer Pippettenspitze in Ampicillin-haltiges LB-Medium überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Von den vermehrten Bakterien wurde Plasmid-DNS isoliert (Mini-Präparation).

### **2.2.1e Mini-Präparation von Plasmid-DNS**

Zur Isolierung von Plasmid-DNS wurde das QIAprep® Miniprep Kit (Fa. QIAGEN) verwendet. Ungefähr 1,5 ml Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min pellettiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 lysiert. Nach Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer N3 wurden die Proben für 10 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spinsäule überführt und bei 10000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit Ethanol-haltigem Puffer und die Elution der Plasmid-DNS mit 50 µl Elutionspuffer TE.

Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### **2.2.1f Restriktionsenzym-Verdau**

Restriktionsverdaue erfolgten nach den Angaben der Hersteller.

Zur Analyse von Plasmid-DNS wurden 1-2 µl Plasmid aus einer Mini-Präparation mit 0,5-1 µl Restriktionsenzymen (je Konzentration in U/µl) und 1 µl des entsprechenden 10x Puffers gemischt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Proben wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.



### 2.2.1g DNS-Sequenzierung

Die DNS-Sequenzierung erfolgte durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, et al., 1977) mit Hilfe des Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kits (Fa. Amersham).

Für die Sequenzierung wurden 350 ng Plasmid-DNS pro kb Plasmidlänge aus Mini-Präparationen mit dem entsprechenden Primer angesetzt und auf vier Reaktionsansätze (je ein ddNTP) verteilt. Die Sequenzreaktionen wurden in einem Thermocycler nach dem folgenden Programm inkubiert:

Denaturierung:	94°C, 2 min
30 Zyklen	
Denaturierung	94°C, 30 sec
Annealing	56°C, 30 sec
Elongation	72°C, 30 sec
Abkühlung	15°C, 10 min
Zugabe der Stopplösung	4 µl
Abschließende Inkubation	72°C, 2 min
Abkühlung	4°C

Die Proben wurden mittels eines LI-COR 4000L DNA-Sequencer (Fa. Licor) in einem 4 %-igen Polyacrylamidgel (0,25 mm dick und 60 cm lang) aufgetrennt.

Die Nukleinsäuresequenz wurde anhand von 3 unabhängigen cDNS-Klonen bestätigt.

### 2.2.1h Auswertung von Sequenzen

Die Analysen der ermittelten bzw. der von Dr. Iris Stallkamp zur Verfügung gestellten Sequenzen wurden durch Vergleich mit in der Genbank publizierten Sequenzdaten mit dem HUSAR-Programmpaket am Großrechner des deutschen Krebsforschungszentrums (DFKZ) in Heidelberg durchgeführt. Das HUSAR-Paket (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) stellt verschiedene

GCG Programme (Genetics Computer Group, USA) zur Analyse der Daten zur Verfügung. Nach Alignment der analysierten Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms PHYLIP die genetischen Distanzen nach der Kimura-2-Parameter Methode (Kimura, 1980) berechnet. Phylogenetische Bäume wurden auf der Basis der ermittelten paarweisen genetischen Distanzen mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) erzeugt. Zur statistischen Absicherung wurden mit 1000 Wiederholungen nach dem Bootstrap-Verfahren (Felsenstein, 1985) durchgeführt.

### **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.2a Kultivierung von Insektenzellen (SF-21)**

Spodoptera frugiperda Zellen (SF-21) wurden in Zellkulturflaschen (Fa. Falcon) mit dem entsprechenden Mediumvolumen pro Flasche (5 ml je T25, 10 ml je T75 und 25 ml je T175) im Brutschrank bei 27°C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung unter sterilen Bedingungen kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde SF-900 II Medium, inklusive Penicillin/Streptomycin und Amphotericin verwendet. Sobald die Zellen 100 % Konfluenz erreicht hatten (nach ungefähr 3-4 Tagen), wurden sie passagiert. Dazu wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 3 ml Medium durch leichtes Klopfen resuspendiert und anschließend auf neue Flaschen im Verhältnis 1:4 aufgeteilt.

#### **2.2.2b Kryokonservierung von Zellen**

Zur Konservierung wurden konfluent wachsende SF-21 Zellen (nicht älter als 15. Passage) im Kulturmedium abgelöst und für 5 min bei 3200 rpm sedimentiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und auf Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zuerst langsam bei -70°C (ü.N.) eingefroren (Mr. Frosty, Fa. NALGENE™) und hinterher über flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C inkubiert und danach unmittelbar in Zellkulturmedium in einer Zellkulturflasche überführt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt.

### 2.2.2c Trypsinieren von Zellen

Nach Abnehmen des Zellkulturmediums wurden die Zellrasen von BHK-21 Zellen mit Trypsin-Lösung (Kapitel 2.1.6a) gewaschen. Nach Inkubation bei 37°C für einige Minuten wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit der Pipette vereinzelt und dann die Zellzahl pro Milliliter bestimmt.

### 2.2.2d Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit Trypanblau-Lösung (Kapitel 2.1.6a) verdünnt und in die Zählkammer gegeben. Unter einem Invertmikroskop wurden 4 große diagonale Quadrate der Kammer ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml: } n \times 4 \times V \times 1000/3,2 \quad \begin{array}{l} n: \text{Zellen in 4 Großquadraten} \\ V: \text{Verdünnungsfaktor} \end{array}$$

### 2.2.2e Transfektion von Insektenzellen

Um rekombinante Baculoviren herzustellen, wurde linearisierte Baculovirus-DNS (Bac-N-Blue™ DNA, Fa. Invitrogen) zusammen mit dem Vektor pBlue-Bac4,5/V5-His, der das klonierte Fremdgen trägt (Kapitel 2.2.1d), in SF-21 Zellen nach der Lipofectin-Methode kotransfiziert. Hier wird das gewünschte Gen durch homologe Rekombination zwischen Baculovirus-DNS und Transfervektor in das Baculovirus-Genom integriert. Die Expression rekombinanter Proteine steht unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors.

Der Transfektionsmix wurde wie folgt angesetzt:

0,5 µg Bac-N-Blue™ DNA  
4,0 µg Rekombinantes Transfer-Plasmid  
1,0 ml SF-900 II Medium (Antibiotikafrei)  
20 µl Cellfectin® Reagent

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen auf einer 60 mm Zellkulturschale ausgesät. Das Medium wurde abgesaugt, der Transfektionsansatz nach 15 min Inkubation bei RT tropfenweise zugesetzt und für mindestens 4 h bei RT auf einer „rocking platform“ inkubiert. Anschließend wurde 1,0 ml Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen für 72 h bei 27°C inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde für die weitere Isolierung der rekombinanten Viren bei 4°C aufbewahrt. Der experimentelle Ablauf der Herstellung rekombinanter Baculoviren ist in Abbildung 2.2 graphisch dargestellt.

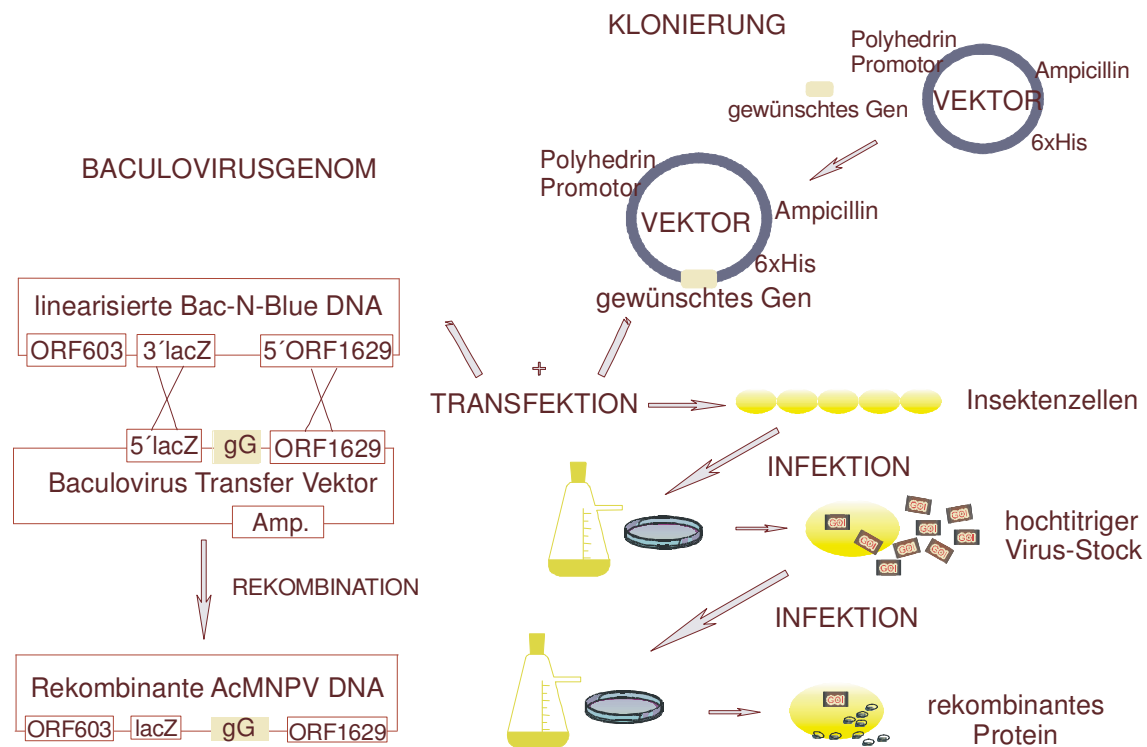


Abbildung 2.2. Herstellung rekombinanter Baculoviren für die Expression von Proteinen.

Die gewonnenen rekombinanten Baculoviren für die Expression des Glykoproteins bzw. Nukleoproteins der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Die rekombinanten Baculoviren Bac. FL-NP, Bac. FL-GP und Bac. PM-NP wurden von Dr. I. Stallkamp zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.2

*Rekombinante Baculoviren.*

Bezeichnung	integriertes Gen	Markierung
Bac. FL-NP*	Nukleoprotein - Tollwutvirusstamm FluryLEP	N-terminal Hexa-histidin
Bac. FL-GP*	Glykoprotein - Tollwutvirusstamm FluryLEP	C-terminal Hexa-histidin
Bac. FL-GPs**	Glykoprotein ohne zytoplasmatische und Transmembran-Regionen - Tollwutvirusstamm FluryLEP	C-terminal Hexa-histidin
Bac. PM-NP*	Nukleoprotein - Tollwutvirusstamm PM 1403	C-terminal Hexa-histidin
Bac. PM-GP**	Glykoprotein - Tollwutvirusstamm PM 1503	C-terminal Hexa-histidin
Bac. PM-GPs**	Glykoprotein ohne zytoplasmatische und Transmembran-Regionen - Tollwutvirusstamm PM 1503	C-terminal Hexa-histidin

\* Anderweitig verfügbaren rekombinanten Baculoviren.

\*\* Im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Baculoviren.

### 2.2.2f Plaque-Test

Mit Hilfe von Plaque-Tests konnten rekombinante Baculoviren nach der Transfektion von Wildtyp-Viren abgetrennt bzw. der Virustiter bestimmt werden.

Zur Durchführung des Plaquetests wurden  $1,8 \times 10^6$  SF-21 Zellen/Well auf eine 6-Well Platte ausgesät. Eine Verdünnungsreihe (entweder des Transfektionsüberstandes oder der Virussuspension) wurde hergestellt ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) und damit die Zellen für 1 h bei RT infiziert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 2 ml/Well eines Überschichtungmediums aus 2 Teilen SF-900 Medium 1,3x, 1 Teil LMP-Agarose Lösung und 150 µg/ml X-Gal überschichtet. Anhand der Expression des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase konnten rekombinante Plaques (blau gefärbt) von Wildtyp-Virusplaques (nicht gefärbt) unterschieden werden.

Nach 4-7 Tagen Inkubation der Platten waren Plaques sichtbar. Zur Reinigung der rekombinanten Viren wurden die blauen Plaques mittels einer sterilen 1 ml Pipettenspitze ausgestochen und auf frische SF-21 Zellen gegeben. Diese Zellen

wurden 7 bis 10 Tage bei 27°C inkubiert, anschließend wurde der Überstand geerntet und bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung des Virustiters wurden die rekombinanten blauen Plaques am Tag 7 nach der Infektion gezählt und der Titer wie folgt berechnet:

$$\text{Titer [pfu/ml]} = 1/\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Anzahl der Plaques}$$

### 2.2.2g Virusvermehrung

#### 2.2.2ga Vermehrung von rekombinanten Baculoviren

Um größere Mengen von Virussuspensionen mit hohem Titer zu gewinnen, wurden  $2 \times 10^7$  SF-21 Zellen in T175 Zellkulturflaschen ausgesät, mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,1 der rekombinanten Baculoviren infiziert und 7-10 Tage bei 27°C inkubiert. Zellkulturüberstand wurde geerntet und der Virustiter durch Plaquetest bestimmt.

Virusstocks wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

#### 2.2.2gb Vermehrung und Reinigung von Tollwutviren

##### - Vermehrung von Tollwutvirus

Zur Vermehrung von Tollwutviren (Stamm CVS oder FluryLEP) wurden BHK-21 Zellen verwendet. Nach Trypsinbehandlung der Zellen (Kapitel 2.2.2c) wurden diese in Suspension mit einer MOI von 0,1 infiziert und bei 37°C in 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 800 g für 15 min abzentrifugiert, in Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FBS) resuspendiert und in Kulturschalen mit 15 cm Durchmesser in einer Dichte von  $1,5 \times 10^7$  Zellen eingesät. Nach einer Adsorptionsphase von 2 h bei 37°C wurde das Medium abgenommen und neues Medium ohne oder mit FBS zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C in 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 72 h. Abschließend wurde der virushaltige Überstand geerntet. Um Zellreste abzutrennen, wurde die Suspension bei 800 g für 15 min zentrifugiert und danach filt-

riert (5 µm Porendurchmesserfilter, Fa. Amicon). Der Virustiter des geklärten Überstands wurde durch Endpunkttitration bestimmt.

#### - Aufreinigung von Tollwutvirus

Mittels Mikrozentrifugenfilters (30 kDa Ausschlußgröße, Fa. Amicon) wurde die geklärte Suspension bis auf ein Endvolumen von ca. 2 ml eingeeengt (der Virustiter wurde bestimmt). Die Reinigung von Virionen erfolgte durch erneute Zentrifugation über einen 10-60 %-igen Saccharose-Stufengradienten. Dazu wurde die konzentrierte Virussuspension auf den Gradienten geladen und bei 25000 rpm für 2 h bei 4°C in einem SW 41 Ti Rotor (Fa. Beckmann) zentrifugiert. Mittels einer Schlauchpumpe wurden Fraktionen von 0,75 ml aus gehend vom Boden des Zentrifugenröhrchens abgezogen. Die gewonnenen Proben wurden bei -70°C gelagert. Die Fraktionen, die eine gereinigte sichtbare Virusbande erhielten, wurden durch Silberfärbung und Immunoblot nach SDS-PAGE (1-D und 2-D) getestet.

#### 2.2.2h Titration von Tollwutviren

Die Endpunkttitrationen von Virussuspensionen erfolgten in 96-well Platten. Pro Well wurden zuerst 50 µl von verschiedenen Verdünnungsstufen der Virussuspension ( $10^{-1}$  bis  $10^{-12}$ ) aufgetragen. Die Titration wurde als sechsfache Bestimmung durchgeführt. Dann wurden  $2 \times 10^4$  BHK-21 Zellen pro Well in 150 µl FBS-haltigem Medium zugegeben und der Ansatz für 72 h bei 37°C in 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

Die Auswertung der Titration erfolgte anschließend mittels direkter Immunfluoreszenz mit einem Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörper (Centocore) gegen das Tollwutvirus Nukleoprotein. Der Titer wurde als TCID<sub>50</sub>/ml berechnet nach der Methode von Spaerman und Kärber angegeben (Kärber, 1931).



### 2.2.3 Proteinanalytische Methoden

#### 2.2.3a Proteinbestimmung

Die Konzentration der Proteine wurde mittels BCA-Methode (BC-Assay, Fa. Uptima) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Bei diesem Verfahren wird das Protein unter alkalischen Bedingungen durch  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen oxidiert. Ein Komplex zwischen den reduzierten  $\text{Cu}^+$  Ionen und Bicinchoninsäure kann durch Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden.

Die Proben und eine Standardreihe mit BSA (zwischen 5 und 500  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden in PBS oder in einem entsprechenden Puffer angesetzt. Zu 25  $\mu\text{l}$  Probe wurden 200  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus Reagenz A und Reagenz B gemischt im Verhältnis 50:1 gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 60°C wurde die Absorption mit Hilfe eines Mikropplatten ELISA-Readers bei 562 nm gemessen.

#### 2.2.3b SDS-PAGE

##### 2.2.3ba Eindimensionale Gelelektrophorese (1-D SDS-PAGE)

Mittels der SDS-PAGE Systeme nach Schägger und von Jagow (Schägger und Jagow, 1987) wurden Proteine nach ihrem molekularen Gewicht in einer vertikalen Gelapparatur aufgetrennt. Die Proben wurden mit 4xVD-Proteinauftragspuffer (mit oder ohne 10 mM DTT) (Kapitel 2.1.6da) vermischt und für 3-5 min bei 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Fa. Invitrogen) verwendet. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 100 V für ca. 80 min. Zur Analyse von Proteinen nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Coomassie bzw. Silber gefärbt oder die Proteine für Immunoblots auf eine Nitrocellulose Membran transferiert.

### 2.2.3bb Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D SDS-PAGE)

Eine zweidimensionale Gelelektrophorese besteht aus der isoelektrischen Fokussierung (IEF) (erste Dimension) und einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (zweite Dimension). In der ersten Dimension werden die Proteine in einen pH-Gradientengel nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Anschließend erfolgt die Trennung nach dem Molekulargewicht.

Die Proben wurden zuerst in Lysis buffer (Kapitel 2.1.6db) solubilisiert und der Proteingehalt bestimmt. 100 bis 300 µg Protein wurde mit Rehydration buffer (Kapitel 2.1.6db) gemischt und für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Es folgte die IEF durch Trennung der Proteine auf 13 cm langen Immobiline® DryStrips (IPG strips, Fa. Amersham Biosciences) mit einem linearen (pH L) oder nicht linearen (pH NL) pH Gradienten von pH 4-7 oder pH 3-10 bei 20°C und 50 mA/strip in einer IPGphor Apparatur (Fa. Amersham Biosciences). Die Strips wurden für 12 h rehydratisiert. Die IEF erfolgte mit einem Gradientenprogramm durch Anlegen einer linearen Spannung, um zwischen 20000 und 30000 Volt-Stunden zu erreichen. Nach der IEF erfolgt eine Inkubation der Strips in SDS equilibration buffer (Zugabe von 20 mM DTT) unter leichtem Schütteln bei RT für 25 min. Zur Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension) wurden die äquilibrierten Strips auf ein 7,5 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgelegt und mit Agarose sealing solution überschichtet. Die Elektrophorese wurde in SDS electrophoresis buffer (Kapitel 2.1.6db) bei einer Anfangsstromstärke von 15 mA für 45 min und einer Laufstromstärke von 60 mA für ungefähr 2 h durchgeführt. Die SDS-PAGE wurde beendet, nachdem die durch Bromophenol blau gefärbte Lauffront am unteren Ende des Gels angekommen war.

Zum Nachweis von Proteinen nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Coomassie bzw. Silber gefärbt oder die Proteine auf eine Membran (Nitrocellulose oder PVDF) transferiert.

Ansatz des 7,5 %-igen Polyacrylamidgels (Gelgröße 16x18 cm; Dicke: 1 mm):

Acrylamid/Bisacrylamid	12,50 ml
4x Resolving gel buffer	12,50 ml
10 % (w/v) SDS	0,50 ml
ddH <sub>2</sub> O	24,25 ml
10 % APS	250 µl
TEMED	16,5 µl

### 2.2.3c Färbung von Proteingelen

#### 2.2.3ca Coomassie-Färbung

Nach Trennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Gele in Coomassie Fixierlösung (Kapitel 2.1.6fa) unter leichtem Schütteln bei RT für ca. 20 min gefärbt. Es folgte die Entfärbung des Gels unter mehrmaligem Wechseln der Entfärberlösung, bis die Proteinbanden erkennbar waren. Nach einer Waschung in einer 5 %-igen Glycerin-Lösung wurde das Gel zwischen zwei Lagen Zellophan in einem Trockenrahmen getrocknet.

#### 2.2.3cb Silberfärbung

Die Silberfärbung ist erheblich sensitiver als die Coomassie-Färbung. Sie kann aber nur beschränkt zur Quantifizierung verwendet werden, weil Silber Proteine unterschiedlich stark anfärbt.

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele zunächst in Fixierlösung (Kapitel 2.1.6fb) für mindestens 1 h oder über Nacht fixiert. Die Gele wurden dann 3x mit einer 50 %-igen Ethanol-Lösung gewaschen und für 1 min in Thiosulfatlösung sensibilisiert. Es folgte die Färbung der Gele mit 0,2 %-iger Silbernitrat-Lösung (Imprägnierlösung) für 20 min. Nach 3-maligem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurden die

Proteine in den Gelen durch Inkubation mit Entwicklungslösung sichtbar gemacht. Die Entwicklungsreaktion wurde mit Stopplösung neutralisiert.

Anschließend wurden die Gele in Zellophan wie zuvor beschrieben getrocknet.

### 2.2.3d Immunoblot

Bei dieser Methode wurden die durch SDS-PAGE (1-D oder 2-D) getrennten Proteine auf eine PVDF oder Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Nitrocellulosemembran, Filterpapier und Gel wurden 15 min in Transferpuffer (Kapitel 2.1.6e) getränkt und luftblasenfrei zusammengelegt. Die Proteintransferverfahren sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.3

*Immunoblot Verfahren.*

Methode	Transferpuffer	Transferbedingungen		
		Spannung	Laufzeit	Temperatur
Semi-Dry Transfer	SD-Blotpuffer	20 V	20 min	RT
Nasstransfer	WB-Puffer nach BJERRUM oder WB_C Puffer	70 V	3 h	4°C

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran bei RT für mindestens 1 h in einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in PBS-Tween (0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS<sup>++</sup>) unter Schwenken inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit PBS<sup>++</sup> wurde diese über Nacht bei 4°C mit einem verdünnten Primärantikörper (Kapitel 2.1.7) inkubiert. Die Membran wurde in der Folge mit PBS<sup>++</sup>, PBS-NaCl (1 M NaCl in PBS<sup>++</sup>) und PBS-Tween jeweils für 30 min gewaschen und darauf für 1 h bei RT mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörper (Sekundärantikörper) inkubiert. Anschließend folgte das Waschen der Membran für 30 min mit PBS-NaCl und für 1 h mit PBS-Tween.

Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Fa. PerkinElmer Life Sciences) nach Vorschrift des Herstellers.

### **2.2.3e N-terminale Peptid-Sequenzierung**

Durch N-terminale Peptid-Sequenzierung, den sogenannten Edman-Abbau (Edman, 1950), werden die Aminosäuren am N-Terminus des Proteins oder Peptids sequenziell chemisch freigesetzt. Nach chromatographischer Auftrennung wird jedes freigesetzte Aminosäurederivat durch einen Vergleich mit einem Standard identifiziert und die Sequenz des Peptids ermittelt.

Zur Peptid-Identifizierung einiger Proteine aus Viruskonzentrat wurden die Proteine zunächst mittels 2-D SDS-PAGE aufgetrennt und dann durch Nass-transfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mit WB\_C-Puffer (Kapitel 2.1.6eb) bei 70 V für 3 h bei 4°C. Die PVDF-Membran wurde mit 0,1 % Coomassie Blue R-250 gefärbt, mit 50 % Methanol entfärbt und bei RT getrocknet. Abschließend konnten Proteinspots lokalisiert und selektiert werden.

Die Sequenzierung des N-Terminus der selektierten Proteine wurde im Wittmann Institute of Technology and Analysis of Biomolecules (WITA GmbH, Deutschland) durchgeführt.

### **2.2.3f Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)**

Bei der MALDI-TOF handelt es sich um eine Methode zur massenspektrometrischen Bestimmung der Molekülmassen spezifischer Peptidfragmente eines Proteins nach enzymatischer Spaltung (z.B. mit Trypsin). Zu diesem Zweck werden die entstehenden Peptidfragmente mit einer Matrix vermischt und kristallisiert. Ein Laserpuls bewirkt die Desorption und eine Ionisation der Peptide. Die geladenen Peptide fliegen abhängig von ihrem Molekulargewicht in Richtung eines Detektors. Aus der gemessenen Flugzeit lässt sich das Verhältnis

Masse zu Ladung ( $m/z$ ) bestimmen und schließlich ein Peptidmassenspektrum erstellen. Durch Abgleich des generierten Spektrums mit bekannten Organismus-spezifischen Proteinsequenzen in der Datenbank erfolgt die Identifizierung des untersuchten Proteins (Aebersold und Mann, 2003). In Abbildung 2.3 ist die MALDI-TOF Methode schematisch dargestellt.

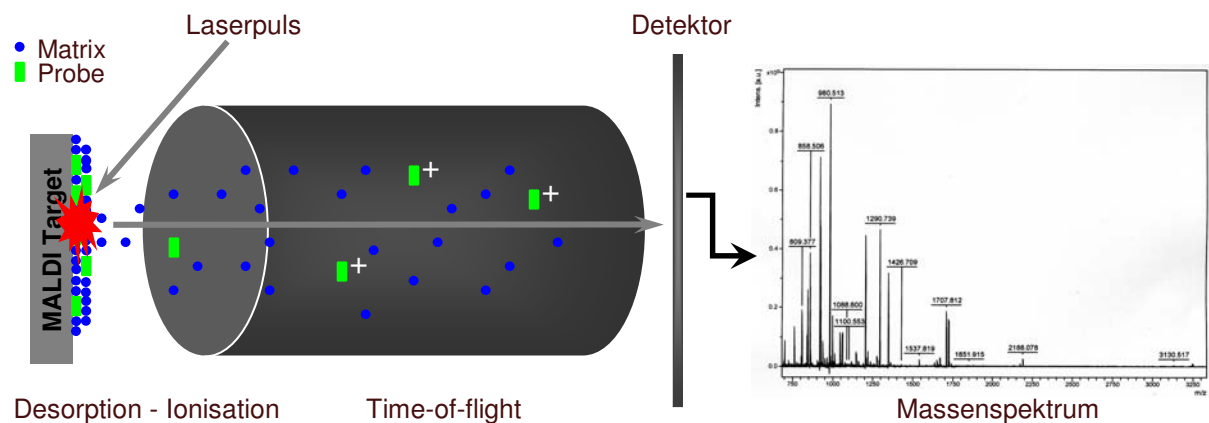


Abbildung 2.3. Prinzip der analytischen Methode MALDI-TOF MS.

Um einzelne Proteine des Viruskonzentrats mittels MALDI-TOF MS zu identifizieren, wurden die Proben durch 2-D SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Inkubation der Strips in 20 mM DTT in SDS equilibration buffer zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde ein zusätzlicher Inkubationsschritt in 200 mM Iodoacetamide in dem gleichen Puffer zur Alkylierung der Cystein-Reste durchgeführt. Nach der zweiten Dimension wurden die Gele entweder mit Coomassie Blue R-250 oder mit der Silberfärbung nach Shevchenko (Shevchenko, et al., 1996) gefärbt. Selektierte Proteinspots wurden direkt aus den Gelen ausgeschnitten. Silbergefärbte Gelstücke wurden nach Gharahdaghi (Gharahdaghi F., 1999) wieder entfärbt. Als negative Kontrolle wurde ein Gelstück aus einem nicht gefärbten Bereich des Coomassie-gefärbten Gels ausgeschnitten und parallel analysiert.

Die MALDI-TOF MS und die Identifizierung der Proteine durch Vergleichen der ermittelten Teilsequenzen mit Proteinsequenzen aus Datenbanken (MASCOT Programm) wurden im Institut für Biochemie, Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Giessen durchgeführt.

### **2.2.4 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine**

#### **2.2.4a Expression des rekombinanten Glykoproteins (GP) und des Nukleoproteins (NP) von Tollwutvirus**

SF-21 Insektenzellen wurden mit einer definierten MOI (0,5) des entsprechenden rekombinanten Baculovirus infiziert und für 55 h (NP) bzw. 67 h (GP) bei 27°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und bei 2000 rpm bei 4°C für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer (LP-N Puffer oder LPG\_SDS Puffer – Kapitel 2.1.6g) mit protease inhibitor Cocktail resuspendiert und bei 4°C ü.N. rotiert. Es folgte eine Zentrifugation der Suspension bei 13000 rpm 4°C für 30 min und die Gewinnung des geklärten Überstandes, welcher das lösliche exprimierte Protein enthielt.

Die Expression des gesuchten Proteins wurde mit Hilfe von Immunoblots und Immunfluoreszenz überprüft.

#### **2.2.4b Reinigung der rekombinanten Proteine**

Zur Reinigung rekombinanter Proteine wurden verschiedene Methoden wie Affinitäts-Chromatographie und Gelelektrophorese mit Elektroelution durchgeführt.

##### **2.2.4ba Affinitäts-Chromatographie**

Mittels Affinitäts-Chromatographie können Proteine durch bestimmte Wechselwirkungen gereinigt werden. Proteine können eine reversible Bindung an

eine Affinitätsmatrix mit kovalent gekoppelten Liganden eingehen und mittels spezifischer Substanzen wieder von den Liganden verdrängt werden.

In dieser Arbeit wurde die Affinitäts-Chromatographie in drei verschiedenen Verfahren realisiert:

- a. Metallionen-Affinitäts-Chromatographie – zur Reinigung Hexahistidin-markierter Proteine
- b. Lektin-Chromatographie (Con-A) – zur Reinigung von Glykoproteinen
- c. Immunaaffinitäts-Chromatographie – zur Reinigung von Proteinen durch spezifische Antikörper.

Für die Herstellung der letztgenannten Affinitätsmatrix wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Tollwutvirusglykoprotein (TW-17) an Protein G Sepharose gekoppelt. Hierzu wurden Antikörper und Protein G Sepharose in Puffer I (Kapitel 2.1.6h) äquilibriert und im Verhältnis von 12 mg mAk/ml Sepharose gemischt und bei 4°C ü.N. inkubiert. Die Sepharose wurde dreimal mit Puffer II gewaschen, in DMP Puffer resuspendiert und für 1 h bei RT rotiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer III wurde die Sepharose mit dem gleichen Puffer für 2 h bei RT rotiert und abschließend mit Puffer I gewaschen. Die Lagerung der Affinitätsmatrix erfolgte bei 4°C in Puffer I.

Als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung wurde geklärter Überstand von mit rekombinanten Baculoviren infizierten Zellen in dem entsprechenden Lysispuffer (Kapitel 2.2.4a) verwendet. Dieser wurde mit einer Affinitätsmatrix gemischt oder auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte Affinitätssäule geladen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C ü.N. Die Affinitätsmatrix wurde nach der Inkubationszeit mit proteinhaltigem Überstand auf eine Chromatographiesäule geladen. Die Säulen wurden mit den entsprechenden Puffern gewaschen und abschließend die gebundenen Proteine in Fraktionen eluiert.

Die Reinheit der Proteine konnte mit Hilfe von SDS-PAGE (Färbung des Gels oder Immunoblot) überprüft werden.



Die Bedingungen der Affinitäts-Chromatographie Verfahren sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4

*Affinitäts-Chromatographie Verfahren.*

	Reinigungsmethoden		
	Metallionen-Affinitäts-Chromatographie	Lektin-Chromatographie (Con-A)	Immunoaffinitäts-Chromatographie
Affinitätsmatrix	Sepharose (TALON™ CellThru Resin)	Sepharose 4B (Con A Sepharose™)	Protein G Sepharose (Protein G Sepharose® 4 Fast Flow)
Ligand	Cobalt	Concanavalin A	monoklonaler Antikörper gegen das G-Protein des Tollwutvirus
Waschpuffer	WP-N Puffer: 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,6 M NaCl 20 % (v/v) Glycerol 10 mM Imidazole	ConA-WP Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,4 0,5 M NaCl	IAC-WP Puffer: 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2
Elutionspuffer	EP-N Puffer: WP-N Puffer 250 mM Imidazole	ConA-EP Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,4 0,5 M NaCl 0,1 - 0,5 M Methylmannopyranosid	IAC-EP Puffer: 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3,5 M MgCl <sub>2</sub> pH 7,2
verwendet zur Reinigung des:			
- rekombinanten Nukleoproteins	X	-	-
- rekombinanten Glykoproteins	X	X	X

### **2.2.4bb Elektroelution nach SDS-PAGE**

Durch Elektroelution nach SDS-PAGE können Proteine unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Diese Methode wurde zur Reinigung des Glykoproteins des Tollwutvirus eingesetzt. Dafür wurden SF-21 Zellen mit den rekombinanten Baculoviren Bac. FL-GP bzw. Bac. PM-GP infiziert und mit LPG\_SDS Puffer lysiert (Kapitel 2.2.4a). Nach der Trennung von Proteinen des geklärten Überstandes aus Zellextrakt mittels SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Die Elektroelution des Proteins erfolgte in einem Micro-Electroelutor (Centilutor<sup>®</sup>, Fa. Amicon<sup>®</sup>) ü.N. bei 50 V und 4°C. Zum Umpuffern und zur Konzentrierung wurde das Eluat mittels Mikrozentrifugenfilter (5 kDa Ausschlußgröße, Fa. Millipore) bei 15°C gegen PBS<sup>++</sup> dialysiert und eingengt. Das isolierte Protein wurde bei -20°C gelagert.

Die Sauberkeit des Proteins ließ sich mit Hilfe von SDS-PAGE (Färbung des Gels oder Immunoblot) überprüfen.

### **2.2.5 Herstellung von polyklonalen Antikörpern**

Um polyklonale Seren herzustellen, wurden Chinchilla-Kaninchen mit ungefähr 50 µg gereinigtem rekombinanten Nukleo-/ bzw. Glykoprotein in Freund's Adjuvans (komplett für die erste Immunisierung und inkomplett für die folgende Immunisierungen) drei Mal immunisiert (Abbildung 2.4). Nach dem Verbringen in Emulsion der Antigen-Adjuvans-Suspension in einem Volumenverhältnis von 1:1 erfolgte die Immunisierung durch subkutane Injektionen von maximal 200 µl je Injektionsstelle. Blutproben wurden durch Punktion der zentralen Ohrarterie in Abständen von zwei bis drei Wochen gewonnen. Das Blut wurde bei RT für 3 h stehen gelassen und danach bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das klare Serum wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die Reaktivität der Serumproben wurde im Immunoblot und in der Immunfluoreszenz bestimmt.

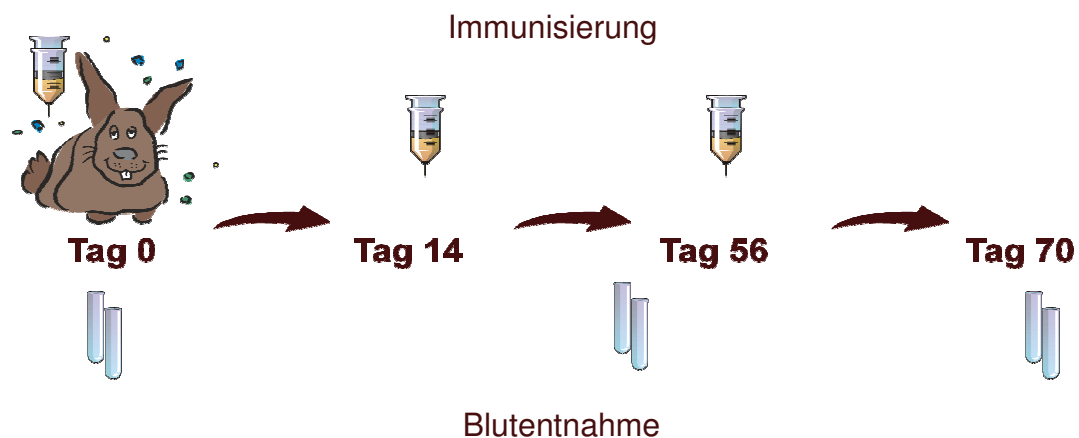


Abbildung 2.4. Immunisierungsschema zur Gewinnung polyklonaler Seren.

### 2.2.6 Fluorescent antibody virus neutralisation test - FAVN-Test

Um die gewonnenen Antikörper gegen das Tollwutvirus Glykoprotein weiter zu charakterisieren, wurde der Gehalt an neutralisierenden Antikörpern durch den FAVN-Test nach Angabe der OIE (Office International des Epizooties) bestimmt. Dies wurde im diagnostischen Labor des Instituts für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen, durchgeführt.

Zunächst wurde das Serum für 30 min bei 56°C in einem Wasserbad inaktiviert, um unspezifische thermolabile Inhibitoren zu entfernen. In 96-well-Platten wurden die Seren in einer geometrischen 1:3 Verdünnungsreihe in Zellkulturmedium (DMEM) eingesetzt (Quadruplikate). Als Kontrollen dienten Kontrollseren (positives Referenzserum (OIE), Internes Standardserum, negatives Standardserum) und Ansätze ohne Serum. Die Virusgebrauchsverdünnung (Tollwutvirusstamm CVS) wurde auf 100 TCID<sub>50</sub>/50 µl eingestellt und zu jeder Serumverdünnungsstufe zugegeben. Zusätzlich wurde eine Titration der Virusgebrauchsverdünnung als 1:4 Verdünnungsreihe angesetzt. Nach einer Inkubation der Ansätze für 1 h bei 37°C in 5 %-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre erfolgte die Zugabe von 50 µl der Indikatorzellen (4x10<sup>5</sup> BHK-21/ml). Die Platten wurden für 48 h bei 37°C in 5 %-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre weiter inkubiert. Abschließend

wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 80 %-igem Aceton fixiert und mittels direkter Immunfluoreszenz (Kapitel 2.2.8aa) markiert und am Fluoreszenzmikroskop Axiovert (Fa. Zeiss) ausgewertet.

Der Titer wurde nach der Methode von Spaerman und Kärber (Kärber, 1931) berechnet und durch Vergleich mit dem mittleren Titer des Referenzserums in International Units (IU/ml) angegeben.

### **2.2.7 Etablierung eines ELISAs**

Die ELISA-Technik (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) basiert auf dem Aufbau einer Bindung zwischen einem definierten Antikörper mit einem spezifischen Antigen, wobei einer der beiden Reaktionspartner an eine feste Phase (z.B. Mikrotiterplatte) gebunden ist. Der Nachweis des Antikörper-Antigen Komplexes erfolgt durch eine enzymatische Reaktion.

Eine weitverbreitete ELISA-Technik ist der Sandwich ELISA. Hierbei handelt es sich um eine Doppel-Antikörper-Methode, die nicht nur dem Nachweis durch Vergleich mit einer erstellten Kalibrierungskurve mit bekannter Konzentration (Standard), sondern auch der Quantifizierung von spezifischen Antigenen dient. Dabei werden Mikrotiterplatten mit einem gegen das gesuchte Antigen gerichteten Antikörper („Capture“- oder Fängerantikörper) beschichtet. Während einer Inkubationszeit mit den Testproben sowie Standards und Kontrollen können immobilisierte Antikörper das zu bestimmende Antigen in den Proben binden. Es folgt die Zugabe eines zweiten enzymgekoppelten Antikörpers (Detektionsantikörper), welcher an das Antigen bindet. Im letzten Schritt des Verfahrens wird ein geeignetes Substrat zugegeben und durch das gekoppelte Enzym umgesetzt, was zu einer Farbreaktion führt. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Menge des gebundenen Enzyms und somit auch zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in den Proben. Die Absorption wird anschließend in einem Photometer (ELISA-Reader) gemessen und zur Auswertung des ELISAs verwendet. Durch wiederholte Waschschrte nach jeder Inkubation werden nicht gebundene Proteine entfernt.

Zum Nachweis und zur Quantifizierung des Glykoproteins bzw. Nukleoproteins von Tollwutvirus in den Viruskonzentraten und den entsprechenden Vakzinen wurde ein Sandwich ELISA etabliert. Die gewonnenen polyklonalen Antikörper (Kapitel 2.2.5) wurden nach Reinigung als Fängerantikörper bzw. nach Biotinylierung als Detektionsantikörper verwendet (Abbildung 2.5).

### **2.2.7a Reinigung von IgG**

Die Reinigung der IgG-Fraktionen wurde mittels einer HiTrap Protein G HP Säule (Fa. Amersham) durchgeführt. Nach der Äquilibration der Säule mit Na-P Puffer (Kapitel 2.1.6i) wurden die polyklonalen Antikörper in dem gleichen Puffer (1:10) mittels einer Pumpe ü.N. bei 4°C in konstantem Kreislauf auf die Säule geladen. Die Säule wurde danach mit dem genannten Puffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Abschließend wurden adsorbierte Antikörper mit Elutionspuffer (Kapitel 2.1.6i) in ca. 0,9 ml Fraktionen eluiert und mit 0,1 ml Tris-HCl, pH 9,0 je Fraktion gepuffert, um zu verhindern, dass die IgG Moleküle wegen des niedrigen pHs im Elutionspuffer degradiert werden. Die Säule wurde gewaschen und in 20 %-igem Ethanol bei 4°C gelagert.

Zur Umpufferung und Konzentrierung wurden die eluierten Antikörper mittels Mikrozentrifugenfilter (30 kDa Ausschlußgröße, Fa. Amicon) bei 15°C gegen PBS<sup>++</sup> dialysiert und eingeengt. Die Lagerung der gereinigten Antikörper erfolgt bei -20°C.

### **2.2.7b Biotinylierung der polyklonalen Antikörper**

Zur Biotinylierung wurde ein Teil der gereinigten Antikörper (Kapitel 2.2.7a) in einer Konzentration zwischen 1-2 mg Ak/ml in B-Puffer (Kapitel 2.1.6j) verdünnt und Biotin-Lösung (Kapitel 2.1.6j) in einer Konzentration von 50 µg/mg Ak zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei RT unter Rotation wurde die Lösung mittels Mikrozentrifugenfilter (30 kDa Ausschlußgröße, Fa.

Amicon) gegen PBS<sup>++</sup> dialysiert. Die biotinylierten Antikörper wurden bei -20°C gelagert.

### **2.2.7c Durchführung des ELISAs**

#### **2.2.7ca Vorbereitung der Proben**

Zur Quantifizierung der viralen G- bzw. N-Proteine in den Viruskonzentraten und den entsprechenden Vakzinen wurden diese unter verschiedenen Bedingungen eingesetzt:

native Bedingungen:

- § direkt ohne Behandlung
- § nach Behandlung mit einem milden Puffer (LP-GV: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 M NaCl, 20 % (v/v) Glycerol, 2 % (v/v) NP-40, pH 7,0)

denaturierende Bedingungen durch Inkubation mit Harnstoff (Lysis Buffer, Kapitel 2.1.6db)

Die gereinigten rekombinanten Glykoproteine bzw. Nukleoproteine wurden als Standard in den entsprechenden ELISAs verwendet. Da diese Proteine aus mit rekombinanten Baculoviren infizierten SF-21 Zellen stammen und auch zur Gewinnung der polyklonalen Seren verwendet wurden, bestand die Möglichkeit von nicht-spezifischen Reaktionen. Daher wurden Suspensionen von solubilisierten, MOCK-infizierten SF-21 Zellen (Lysat-Präparationen) parallel als Hintergrundkontrolle eingesetzt.

Standards und Hintergrundkontrolle wurden zunächst auf eine Proteinkonzentration von 25 µg/ml mit PBS<sup>++</sup> eingestellt. Davon ausgehend wurden sie parallel mit den Proben in geometrischen 1:2 Verdünnungsreihen im ELISA eingesetzt.

### 2.2.7cb Ablauf des ELISAs

Der Ablauf des ELISAs ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Zunächst wurde eine 96-well Platte Nunc-Immuno Modul mit 50 µl des gereinigten Fängerantikörpers (2 µg/ml) in PBS<sup>++</sup> mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> ü.N. bei 4°C beschichtet. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Platte mit 200 µl ELISA Blockpuffer (Kapitel 2.1.6k) pro Vertiefung für 1 h bei RT blockiert. 50 µl der Verdünnungsreihen des Antigen-Standards bzw. der zu messenden Ansätze wurden als Mehrfachansatz nach Entfernung des Blockpuffers für 1,5 h inkubiert; PBS<sup>++</sup> diente als Leerwert. Danach erfolgte die Inkubation der Platte mit 50 µl Detektionsantikörper (10 µg/ml) in PBS<sup>++</sup> mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> für weitere 1,5 h bei RT. Im nächsten Schritt wurde Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Fa. Dianova) in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben (50 µl je Vertiefung) und für 45 min bei RT inkubiert. Ein drei- bis viermaliges Waschen der Platte mit ELISA Waschpuffer (Kapitel 2.1.6k) folgte jedem der genannten Reaktionsschritte. Abschließend wurden 50 µl ELISA Substratpuffer (Kapitel 2.1.6k) pro Well zugegeben und bei RT für ca. 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl ELISA Stopplösung gestoppt. Die Absorption wurde in einem ELISA-Reader (SLT spectra) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

### 2.2.7d Berechnung der Standardkurve

Die Messwerte der Mehrfachbestimmung der Proben, Standards, Hintergrundkontrollen und Leerwert je Ansatz wurden gemittelt und der gemittelte Leerwert von allen gemessenen Ansätzen subtrahiert. Danach wurden die Mittelwerte der Hintergrundkontrollen von den entsprechenden Mittelwerten des Standards abgezogen.

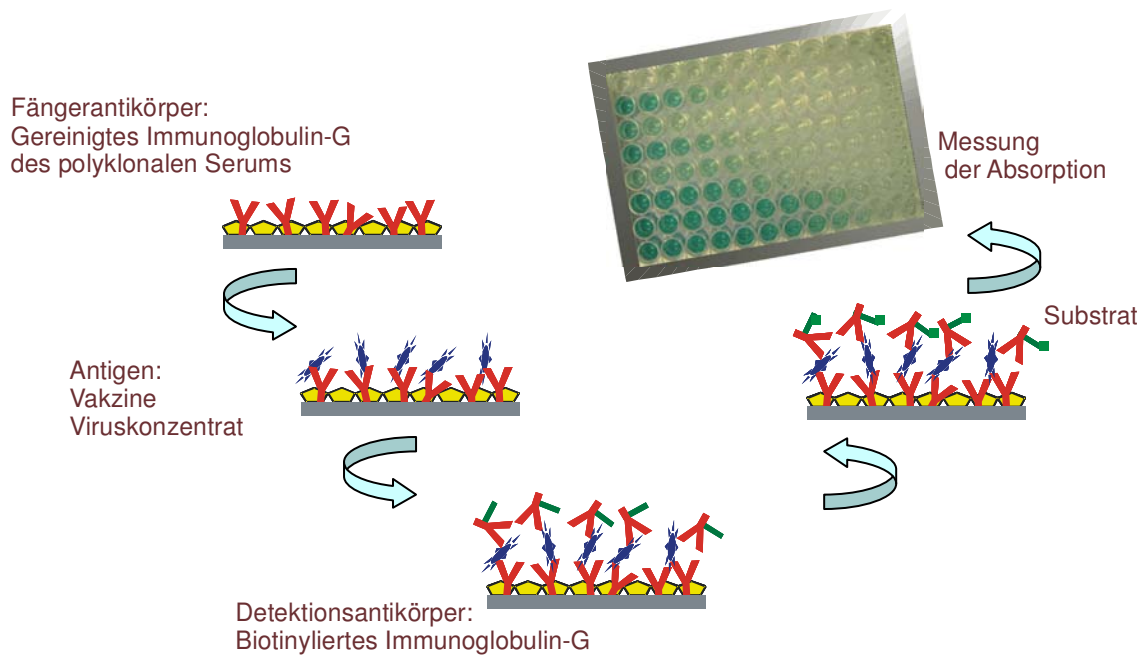


Abbildung 2.5. Schematische Darstellung des Sandwich ELISA Verfahrens.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen gegen die gemittelten Extinktionswerte aufgetragen. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte durch nicht-lineare Regression. Diese wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (Leiter Dr. K. Failing) durchgeführt. Die Berechnung der G- bzw. N-Proteinkonzentrationen in den Viruskonzentrationen und in den Vakzinen erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\lg PK = - \frac{\ln \left( \frac{E}{OD} - 1 \right) - a}{b}$$

PK Proteinkonzentration

E Endwert

OD optische Dichte

a Verschiebung auf x-Achse

b exponentielle Steilheit



Um die in den Proben tatsächliche enthaltene Konzentration der G- bzw. N-Proteine zu bestimmen, wurden die berechneten Proteinkonzentrationen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert und die Ergebnisse schließlich in µg/ml angegeben.

### **2.2.8 Mikroskopie**

#### **2.2.8a Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die Immunfluoreszenz nutzt mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper, um bestimmte Antigene nachzuweisen. Bei der direkten Immunfluoreszenz sind die Antikörper mit der Spezifität für das nachzuweisende Antigen direkt an fluoreszierende Moleküle gekoppelt. Im Gegensatz dazu werden bei der indirekten Immunfluoreszenz die antigenspezifischen Antikörper durch einen zweiten fluoreszenzmarkierten antispezies-Antikörper nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurden sowohl die direkte Immunfluoreszenz als auch die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

##### **2.2.8aa Direkte Immunfluoreszenz**

Die direkte Immunfluoreszenz wurde zum Nachweis der Expression des Tollwutvirusnukleoproteins (Kapitel 2.2.4a), für Tollwutvirustitration (Kapitel 2.2.2h) und für den FAVN-Test (Kapitel 2.2.6) verwendet. Zur Darstellung des Antigens wurden die Zellen zunächst entweder mit 80 %-igem (v/v) Aceton für 30 min bei RT oder mit einer auf -20°C vorgekühlten 1:1 Aceton/Methanol Lösung für 15 min bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Nach der Entfernung der Fixanten wurden die Zellen luftgetrocknet. Es folgte eine Inkubation für 1 h entweder bei 27°C (SF-21 Insektenzellen) oder bei 37°C (BHK-21 Zellen) mit dem FITC-markierten monoklonalen Antikörper gegen das Nukleoprotein des Tollwutvirus (Fa. Microtest) in PBS oder ABDB-A Puffer (Kapitel 2.1.6a). Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS<sup>++</sup> wurde dieser an einem Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert (Fa. Zeiss) ausgewertet.

### 2.2.8ab Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde zum Nachweis der Expression von Tollwutvirusglykoprotein (Kapitel 2.2.4a) und zur Charakterisierung der hergestellten polyklonalen Seren verwendet. SF-21 bzw. BHK-21 Zellen wurden mit einer auf -20°C vorgekühlten 1:1 Aceton/Methanol-Lösung für 15 min bei 4°C oder mit 80 %-igem Aceton für 30 min bei RT fixiert und permeabilisiert. Nach der Lufttrocknung der Zellen folgte eine Inkubation für 1 h bei 27°C bzw. 37°C mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Glykoprotein des Tollwutvirus (Kapitel 2.1.7) oder einem polyklonalen Antikörper gegen Tollwutvirus (Kapitel 2.2.5) in ABDB-A Puffer (Primärantikörper). Die Zellrasen wurden zwei Mal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Die folgende Inkubation mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper (Sekundärantikörper, Kapitel 2.1.7) für 1 h bei 27°C diente dem Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach abschließendem Waschen des Zellrasens mit PBS<sup>++</sup> wurde dieser an einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

### 2.2.8b Immunelektronenmikroskopie

Durch Immunelektronenmikroskopie wurde das Glykoprotein bzw. das Nukleoprotein des Tollwutvirus in den Viruskonzentraten und den entsprechenden Vakzinen nachgewiesen. Viruspartikelsuspensionen wurden zunächst auf mit Pioloform beschichteten, kohlebedamften und beglimmten 400-mesh Kupfer/Rhodiumnetzen (Fa. Plano) für 30 min adsorbiert. Nach einer Inkubation mit 1 %-igem BSA für 15 min wurden die Netze sechs Mal mit PBS (je 1 min) gewaschen. Diese wurden dann mit dem hergestellten polyklonalen Antikörper (Kapitel 2.2.5) oder einem monoklonalen Antikörper gegen das Glykoprotein des Tollwutvirus (Kapitel 2.1.7) in 1 %-igem BSA für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer weiter inkubiert. Nach erneuten sechsmaligem Waschen der Netze mit PBS folgte eine Inkubation für 1 h mit Gold-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen oder Ziege-anti-Maus Antikörper. Abschließend wurden die Netze drei Mal mit PBS und drei Mal mit ddH<sub>2</sub>O (je 1 min) gewaschen. Die Kontras-

tierung erfolgte mit 2 %-igem Methylaminwolframat für 30 sec. An einem Transmissionselektronenmikroskop TM 910 (Fa. Zeiss) wurden die erhaltenen Präparate ausgewertet. Aufnahmen der Präparate wurden auf Kodak SO-193 Filmen angefertigt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Charakterisierung der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503

##### 3.1.1 Analysen auf der Basis von Nukleinsäuresequenzen

Die Sequenzierung der kompletten Genome der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 wurde von Dr. Iris Stallkamp durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen der für Nukleo-, Phospho-, Matrix- und Glykoprotein (N-P-M-G) und Largeprotein (L) kodierenden Genombereiche wurden mit publizierten Sequenzen anderer Vertreter der Spezies Rabies Virus verglichen. Die Genbank-Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Der Schwerpunkt der Analysen wurde auf die kodierenden Sequenzen von Nukleo- und Glykoproteinen gelegt, da diese die wichtigsten Virusproteine im Hinblick auf die Induktion einer antiviralen Immunantwort sind.

Tabelle 3.1

*Genbank-Zugangsnummern von kompletten Genomsequenzen von Tollwutviren.*

<b>Virusstamm</b>	<b>Genbank-Zugangsnummer</b>	<b>Referenz</b>
FluryLEP	DQ099524	Stallkamp, I., Lopez-Yomayuza, C.C. and Thiel, H.-J. 2005
PM 1503	DQ099525	Stallkamp, I., Lopez-Yomayuza, C.C. and Thiel, H.-J. 2005
FluryHEP	AB085828	Morimoto, K. 2002
PV	M13215	Tordo, N. et al. 1988
SAD-B19	M31046	Conzelmann, K.K. et al. 1990

Zur phylogenetischen Analyse wurden die Nukleinsäuresequenzen der Genombereiche, die für die N-P-M-G- und L-Proteine kodieren, verglichen und der Grad der Divergenz berechnet (Kimura, 1980). Phylogenetische Bäume

wurden auf der Basis der Distanzmatrix mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode erzeugt (Saitou und Nei, 1987). Abbildung 3.1. zeigt die resultierenden phylogenetischen Bäume.

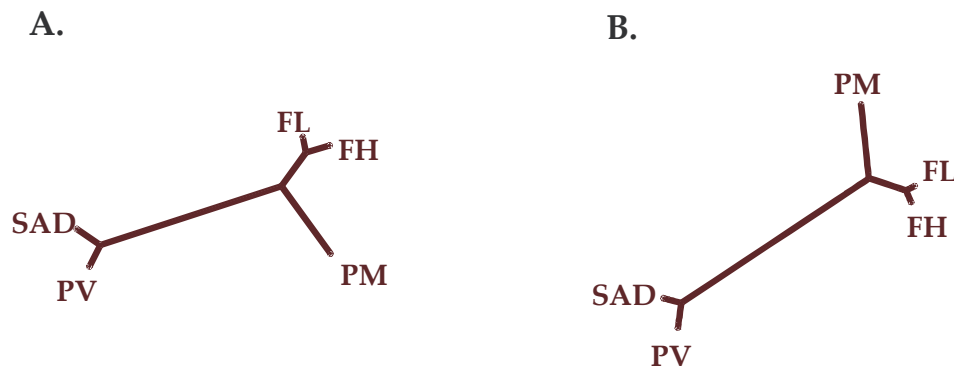


Abbildung 3.1. Phylogenetische Bäume von Tollwutviren.

A. Alignment auf der Basis von Nukleinsäuresequenzen der für Nukleo-, Phospho-, Matrix- und Glykoproteine (N-P-M-G) kodierenden Genombereiche. B. Alignment auf der Basis der Nukleinsäuresequenzen der für das Largeprotein kodierenden Genombereiche. Tollwutvirusstämme: FL= FluryLEP; FH= FluryHEP; PM= PM 1503; SAD= Street-Alabama-Dufferin; PV= Pasteur Virus.

Der Nukleinsäuresequenzvergleich der Genombereiche der verschiedenen Virusstämme ergab eine Homologie zwischen 90 und 99 % (Tabelle 3.2 A und B) und somit eine nahe phylogenetische Verwandtschaft der untersuchten Stämme. Die Homologie zwischen FluryLEP und PM 1503 lag bei 95,19 % (N-P-M-G) bzw. 96,63 % (L). Der Stamm FluryLEP zeigte die höchste Nukleinsäuresequenzhomologie zu dem Virusstamm FluryHEP (98,59 % (N-P-M-G) bzw. 99,47 % (L)). Die beiden Stämme sind phylogenetisch offenbar enger miteinander verwandt als mit den Stämmen PM 1503, PV und SAD; dies bestätigt den gemeinsamen Ursprung der beiden Viren (Meslin, et al., 1996).

Analoge Ergebnisse zeigte der Vergleich der für das N- und G-Protein kodierenden Sequenzen. Das Nukleoprotein des FluryLEP Stammes zeigte eine Homologie auf Nukleotidebene von 99,26 % im Vergleich zum Stamm FluryHEP, aber nur 92,98 % zum Stamm PV. Im Vergleich zu PM 1503 und CVS (Genbank Zugangsnummer: AF406696) betrug die Homologie 97,27 % bzw. 97,12 % (Tabelle 3.2 C).

Die Homologie zwischen den Nukleotidsequenzen der für das Glykoprotein kodierenden Regionen der Stämme FluryLEP und FluryHEP lag bei 98,48 %, während die Homologie zwischen FluryLEP und CVS bzw. PM 1503 jeweils 94,48 % betrug (Tabelle 3.2 C).

### **3.1.2 Analysen auf der Basis von Aminosäuresequenzen**

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der N-, P-, M-, G- und L-Proteine der untersuchten Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 mit denen der Stämme FluryHEP, SAD und PV zeigte eine geringe Divergenz.

Wie bereits beschrieben sind die wichtigsten viralen Antigene, die nach einer Tollwutvirusinfektion eine schützende Immunantwort induzieren, das Nukleoprotein und das Glykoprotein. Hohe Antikörpertiter werden gegen beide Proteine gebildet. Außerdem induziert das Glykoprotein die Synthese neutralisierender Antikörper. Daher ist die Analyse der Homologien dieser Proteine zwischen verschiedenen Tollwutvirusstämmen, insbesondere der Bereiche, in denen bekannte Antigenregionen lokalisiert sind, von besonderem Interesse.

Die Homologien der Nukleoproteinsequenzen zwischen den genannten Stämmen sowie dem Tollwutvirusstamm CVS lagen zwischen 98,22 % und 99,6 % mit einer hohen Konservierung der bekannten Antigenregionen (Abbildung 3.2). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen des Glykoproteins ergab eine Homologie von 91,6-96,2 %. Auch die Antigenregionen des Glykoproteins sind zwischen den verglichenen Stämmen weitgehend konserviert. Allerdings gibt es Aminosäureaustausche an den Positionen 40 („Antigenic site II“), 255 und

256 („Antigenic site IV“) sowie an Position 333 („Antigenic site III“) (Abbildung 3.3).

Tabelle 3.2

*Homologie zwischen Tollwutviren der Spezies Rabies Virus.*

A.

Stamm	FluryLEP N-P-M-G-Proteine	FluryLEP Largeprotein
FluryLEP	-	-
FluryHEP	98,59	99,47
PM 1503	95,19	96,63
PV	91,21	90,87
SAD-B19	91,04	91,60

B.

Stamm	PM 1503 N-P-M-G-Proteine	PM 1503 Largeprotein
PM 1503	-	-
FluryLEP	95,19	96,63
FluryHEP	94,98	96,49
PV	90,38	90,33
SAD-B19	90,23	91,09

C.

N G	FluryLEP	FluryHEP	PM 1503	CVS	PV	SAD- B19
FluryLEP		99,26	97,27	97,12	92,98	93,05
FluryHEP	98,48		97,04	96,75	92,76	92,83
PM 1503	94,48	94,48		99,70	92,68	92,83
CVS	94,48	94,48	99,49		92,76	92,90
PV	90,60	90,73	89,65	89,65		98,97
SAD-B19	90,22	90,35	89,33	89,33	98,03	

*Anmerkungen.* Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der Stämme FluryLEP (A) und PM 1503 (B) mit denen anderer Tollwutvirusstämme. N-P-M-G= Alignment auf der Basis der Nukleinsäuresequenzen der Nukleo-, Phospho-, Matrix- und Glykoproteine. L= Alignment auf der Basis der Nukleinsäuresequenzen des Largeproteins. C. Homologie zwischen den für das Nukleoprotein (N) und das Glykoprotein (G) von Tollwutviren kodierenden Nukleotidsequenzen.



**Abbildung 3.2.** Vergleich der Aminosäuresequenzen des Nukleoproteins der Tollwutvirusstämme FluryLEP (FL), FluryHEP (FH), PM 1503 (PM), CVS, PV und SAD-B19.

Die Striche bedeuten konservierte Aminosäuren. Einige Antigenregionen des Proteins sind durch Rahmen mit durchgehenden Linien dargestellt. Die Antigenomänen der „Antigenic Site IV“ sind durch Rahmen mit unterbrochenen Linien gekennzeichnet.

Untersuchungen der extrazellulären Region des G-Proteins zeigten Differenzen in Position und Anzahl potenzieller N-Glykosylierungsstellen bei den verschiedenen Stämmen. Die potenziellen N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 37 und 319 sind zwischen den analysierten Virusstämmen konserviert. Der Stamm FluryLEP besitzt drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 37, 158 und 319. Während die Stämme FluryLEP, FluryHEP und PV eine potenzielle Stelle an Asn158 haben, besitzen die Stämme PM 1503 und CVS eine an Position 204. Die Stämme PV und SAD beinhalten eine potenzielle Stelle an



Asn247 (Abbildung 3.3). Bezüglich der Anzahl von Cysteinen besitzen die Stämme FluryLEP und PM 1503 in der extrazellulären Region vierzehn Cysteine, die bei allen untersuchten Stämmen konserviert sind.

### **3.2 Gewinnung und Charakterisierung von polyklonalen Seren**

#### **3.2.1 Herstellung von rekombinanten Baculoviren**

Für die Expression des Glykoproteins und des Nukleoproteins der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 wurde das Baculovirus-Expressions-System verwendet. Die rekombinanten Proteine wurden unter Kontrolle des Polyhedrin-Promotors exprimiert.

Nach Klonierung der entsprechenden Sequenzen in den Baculovirus-Transfervektor (Vektor pBlueBac4.5/V5-His) wurden diese zusammen mit linearisierter Baculovirus-DNS (Bac-N-Blue™, Fa. Invitrogen) in SF-21 Insektenzellen kotransfiziert (Kapitel 2.2.2e). Rekombinante Baculoviren ließen sich mittels Plaquetest von Wildtyp-Viren abtrennen (Kapitel 2.2.2f). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten sowie die anderweitig verfügbaren rekombinanten Baculoviren sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

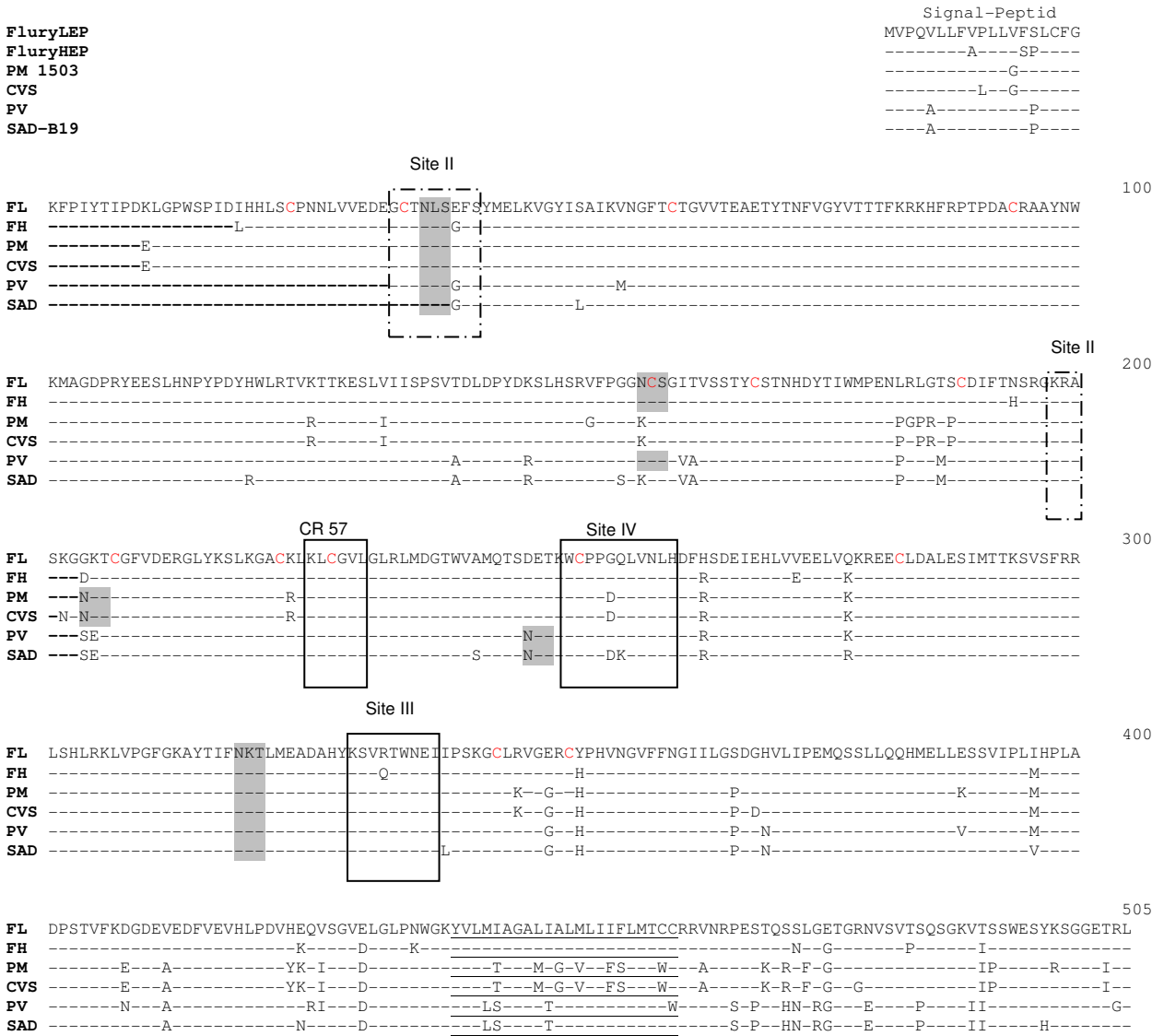


Abbildung 3.3. Vergleich der Aminosäuresequenzen des Glykoproteins der Tollwutvirusstämme FluryLEP (FL), FluryHEP (FH), PM 1503 (PM), CVS, PV und SAD-B19.

Die Striche bedeuten konservierte Aminosäuren. Einige Antigenregionen des Proteins sind durch Rahmen mit durchgehenden Linien gekennzeichnet. Die Antigendomänen, welche die „Antigenic site II“ bilden, sind durch Rahmen mit unterbrochenen Linien bezeichnet. Die Transmembran-Region ist unterstrichen. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Region sind grau hinterlegt. Cysteine in der extrazellulären Region sind rot dargestellt.

Die korrekte Insertion der Zielsequenzen wurde mittels PCR überprüft (Abbildung 3.4). Die gewählten Primer amplifizierten Sequenzen unterhalb des Polyhedrin-Promotors. Rekombinanten, die zu Amplifikaten der erwarteten Größe ohne eine dem Wildtyp-Virus entsprechende Bande führten, wurden durch Sequenzierung überprüft und anschließend für Virusvermehrung und Expression der rekombinanten Proteine verwendet.

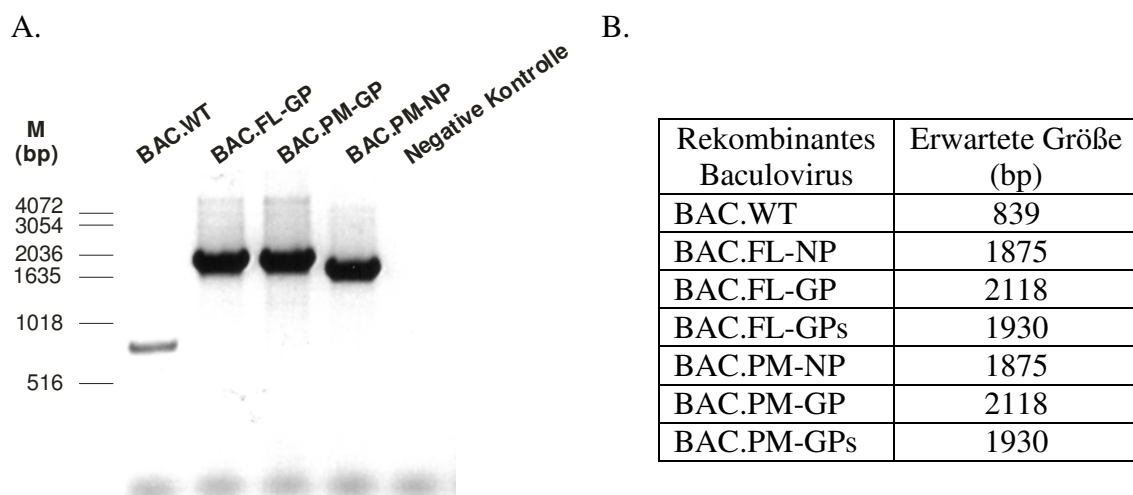


Abbildung 3.4. Identifizierung rekombinanter Baculoviren mittels PCR (A) und erwartete Größe der Insertionen (zuzüglich 525 Basenpaare (bp) aus dem Vektor) (B).

M: DNS-Marker. BAC.: Baculovirus. WT: Wildtyp. FL: FluryLEP Tollwutvirusstamm. PM: PM 1503 Tollwutvirusstamm. NP: N-Proteingen. GP: G-Proteingen. GPs: G-Proteingen ohne zytoplasmatische und Transmembran Regionen (B).

### 3.2.2 Expression des Glyko-/Nukleoproteins der Tollwutvirusstämme Flury-LEP und PM 1503

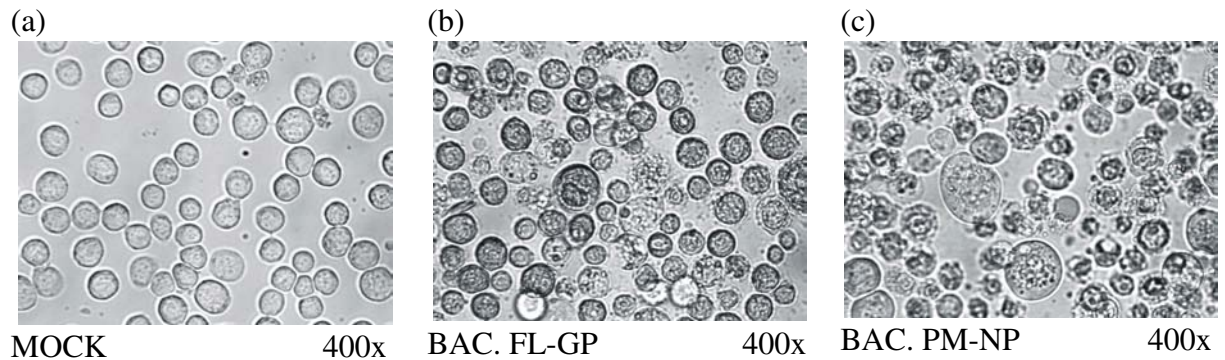
Ausgehend von Virusstocks der rekombinanten Baculoviren (Kapitel 2.2.2ga) wurden SF-21-Insektenzellen infiziert. In der Phasenkontrastmikroskopie waren Zeichen einer Infektion der Insektenzellen deutlich erkennbar, u.a. Vergrößerung des Zellkerns, Ablösung der Zellen und Zell-Lyse (Abbildung 3.5 A). Die Expression des Glyko- und Nukleoproteins des Tollwutvirus wurde unter der Verwendung von Antikörpern gegen G bzw. N durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Als Kontrolle dienten MOCK infizierte SF-21 Insektenzellen (Abbildung 3.5 B).

Um optimale Expressionsbedingungen zu ermitteln, wurden verschiedene Virusinokulationsdosen (MOI zwischen 0,5 und 10) und Erntezeitpunkte (zwischen 24 und 96 h) getestet. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE in Verbindung mit Silberfärbung und Immunoblot unter Verwendung eines monoklonalen anti-Penta-His Antikörpers (Fa. Qiagen). Bei Verwendung verschiedener MOI konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge der exprimierten Proteine ermittelt werden. Hingegen zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Dauer der Infektion auf die erzielte Menge rekombinanter Proteine. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in der Folge eine MOI von 0,5 und eine Inkubationszeit von 55 h (Nukleoprotein) bzw. 67 h (Glykoprotein) für die Expression der Proteine verwendet.

### 3.2.3 Reinigung der rekombinanten Proteine

Nach Expression der rekombinanten Proteine wurden verschiedene Reinigungsmethoden wie Affinitäts-Chromatographie und Elektroelution durchgeführt (Kapitel 2.2.4).

## A. Phasenkontrast



## B. Immunfluoreszenz

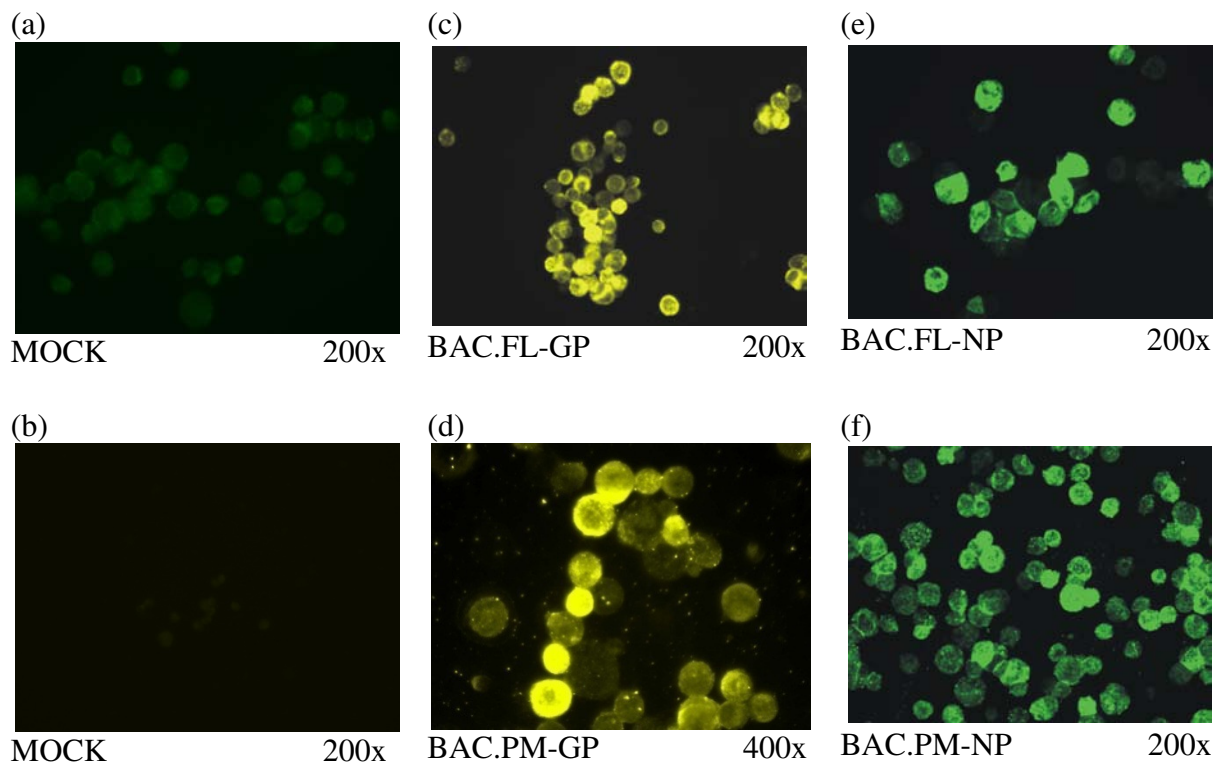
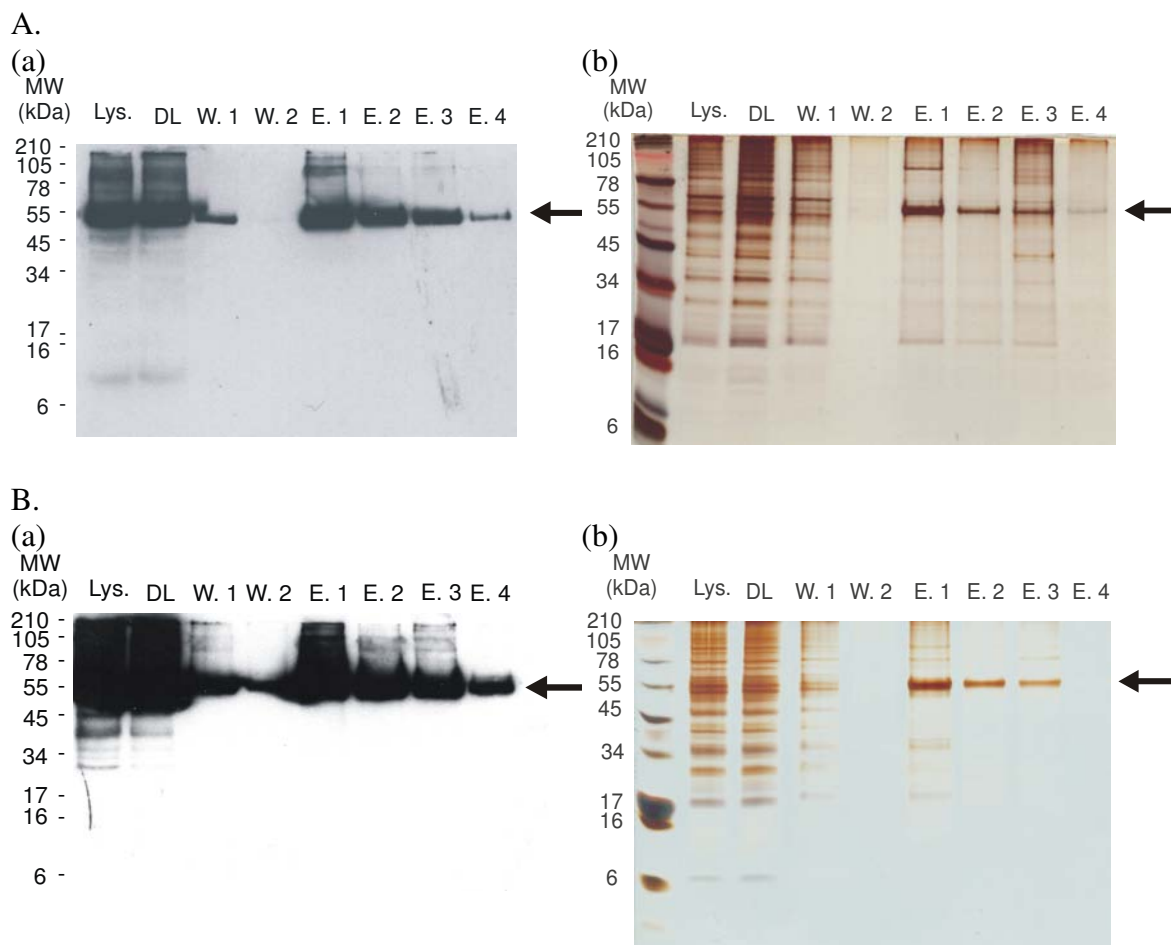


Abbildung 3.5. Mikroskopische Analyse infizierter Insektenzellen.

A. Phasenkontrast-Bilder von MOCK infizierten SF-21 Insektenzellen (a), BAC.FL-GP infizierten Zellen (b) und BAC.PM-NP infizierten Zellen (c). B. Expression des Glykoproteins (c und d) und des Nukleoproteins (e und f) der Tollwutvirusstämme FluryLEP (c und e) und PM 1503 (d und f). Als negative Kontrolle dienten MOCK infizierte Zellen (a und b). Der Nachweis des Glykoproteins erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers TW-17 (Fa. Chiron Vaccines) und eines Cy3-Ziege anti-Maus (Fa. Dianova) Sekundärantikörpers. Zum Nachweis des Nukleoproteins wurde ein FITC markierter monoklonaler Antikörper gegen N (Fa. Microtest) eingesetzt.

Das rekombinante Nukleoprotein beider Tollwutvirusstämme ließ sich mittels Metallionen-Affinitäts-Chromatographie reinigen. Ausgangsmaterial (Lysat), Durchlauf-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden parallel in der Silberfärbung und im Immunoblot analysiert. Eine intensive Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 55 kDa, der erwarteten Größe des Nukleoproteinmonomers, war in beiden Verfahren erkennbar (Abbildung 3.6).



*Abbildung 3.6.* Reinigung des N-Proteins der Virusstämme FluryLEP (A) und PM 1503 (B) mittels Metallionen-Affinitäts-Chromatographie.

(a) Immunoblot unter Verwendung eines monoklonalen anti-Penta-His-Antikörpers. (b) Silberfärbung. Der Pfeil weist auf die Nukleoproteinbanden. Lys: Lysat; DL: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion; MW: Proteinmarker, Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

Zur Reinigung des rekombinanten Glykoproteins beider Virusstämme wurden verschiedene Chromatographiemethoden wie Metallionen-Affinitäts-Chromatographie, Lektin-Chromatographie und Immunoaffinitäts-Chromatographie durchgeführt. Eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 67 kDa, die der erwarteten Größe des Glykoproteinmonomers entspricht, war im Immunoblot nachweisbar (Abbildung 3.7 A(a), B(a) und C(a)). Allerdings zeigte die Silberfärbung eine Vielzahl weiterer Proteine in den Elutionsfraktionen (Abbildung 3.7 A(b), B(b) und C(b)). Die geschilderten Verfahren erbrachten somit nicht die benötigte Reinheit des Proteins. Außerdem ließ sich das Glykoprotein als Membran-Protein nicht ohne weiteres solubilisieren. Daher wurde es ohne zytoplasmatische und Transmembran-Region exprimiert. In diesem Fall war die Menge an sezerniertem Protein sehr gering (Daten nicht gezeigt).

Da die Reinigung des Glykoproteins in nativer Form in den oben beschriebenen Ansätzen nicht erfolgreich war, wurde eine Elektroelution nach SDS-PAGE durchgeführt (Kapitel 2.2.4bb). Anschließend wurde eine deutliche Bande in der erwarteten Größe des Proteins im Immunoblot bzw. in der Silberfärbung nachgewiesen (Abbildung 3.7 D(a) und D(b)).

### **3.2.4 Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Seren**

Um Nukleo- und Glykoprotein des Tollwutvirus in den Impfstoffen zu identifizieren, war es notwendig, spezifische Seren herzustellen. Dafür wurden für jedes Protein zwei Kaninchen je drei Mal immunisiert und regelmäßig Serum gewonnen (Kapitel 2.2.5). Als Antigene wurden die mittels Metallionen-Affinitäts-Chromatographie gereinigten Nukleoproteine der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 sowie das durch Elektroelution gereinigte Glykoprotein des Tollwutvirusstamms FluryLEP eingesetzt.

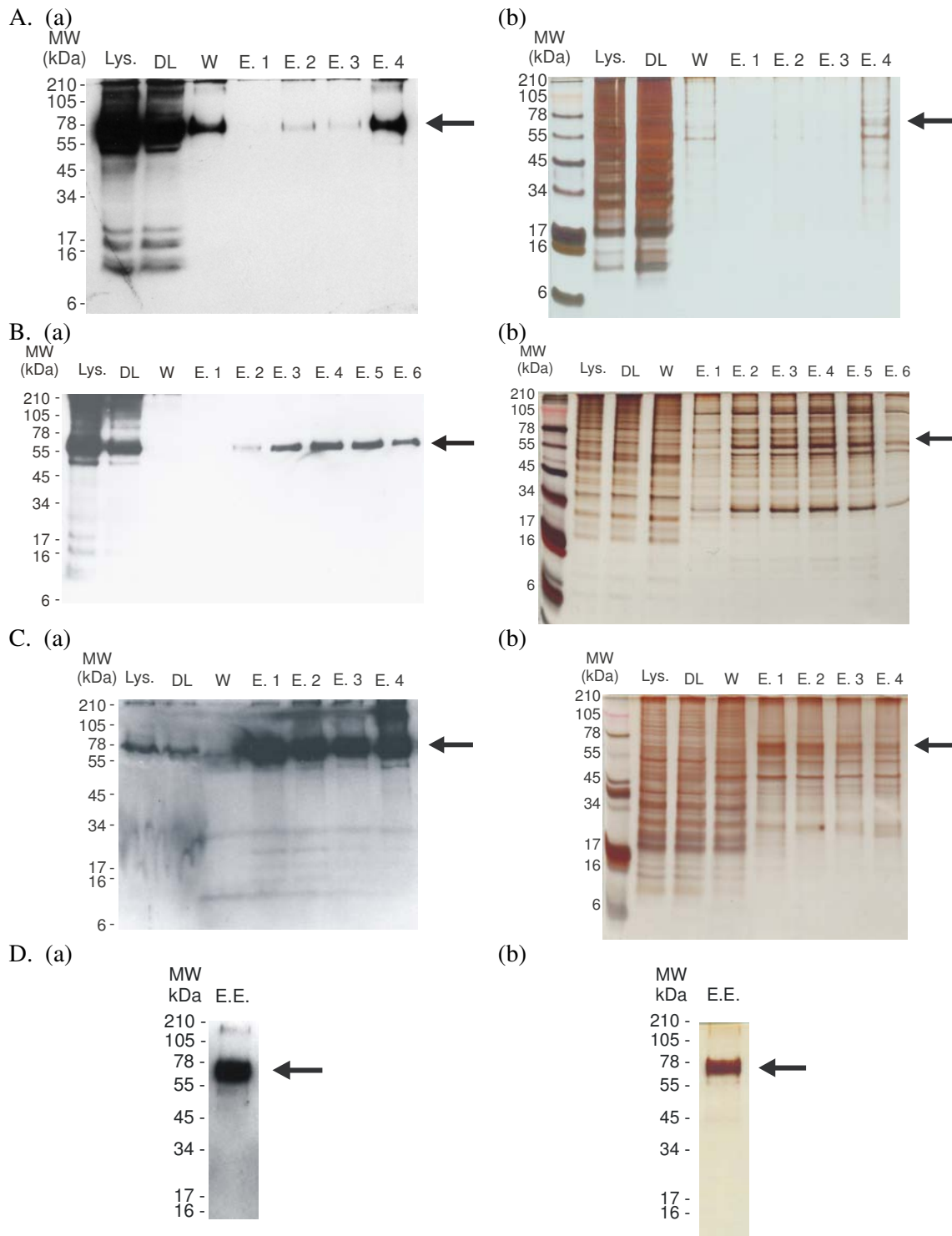


Abbildung 3.7. Reinigung des rekombinanten Tollwutvirusglykoproteins.

Proteinreinigung mittels Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (A), Lektin-Chromatographie (B), Immunoaffinitäts-Chromatographie (C) und Elektroelution nach SDS-PAGE (D). (a) Immunoblot unter Verwendung eines monoklonalen anti-Penta-His Antikörpers. (b) Silberfärbung. Der Pfeil weist auf die Glykoproteinbanden. Lys: Lysat; DL: Durchlauf; W: Waschschritt; E: Elutionsfraktion; E.E.: Elektroeluierte Fraktion; MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).



Um die erhaltenen Seren näher zu charakterisieren, wurde ihre Reaktivität im Immunoblot und in der Immunfluoreszenz untersucht. Zusätzlich wurden die gegen das Glykoprotein hergestellten Seren im FAVN-Test (Kapitel 2.2.6) auf Virusneutralisation getestet.

### 3.2.4a Reaktivität der Seren im Immunoblot

Gleiche Proteinmengen der beiden Viruskonzentrate und der entsprechenden Impfstoffe „Rabipur“ und „Rabivac“ wurden elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot unter Verwendung der beschriebenen polyklonalen Seren analysiert. Alle Seren zeigten eine starke Reaktivität mit den entsprechenden Antigenen. Die Differenzen in der Intensität der Reaktion beim Vergleich der Viruskonzentrate und Impfstoffe weisen auf den unterschiedlichen Anteil der spezifischen Proteine an der gesamten Proteinmenge in den Proben hin (Abbildung 3.8).

Die Seren gegen das Nukleoprotein wiesen eine Bande mit einer Proteingröße von ca. 55 kDa nach. Diese Bande entspricht der erwarteten Größe des Nukleoproteinmonomers (Abbildung 3.8 A).

Mit Hilfe der Seren gegen das Glykoprotein wurde eine Bande in der Höhe von ungefähr 67 kDa (Glykoproteinmonomer) und weitere schwächere Banden mit höheren Molekulargewichten (ca. 105 und 200 kDa) nachgewiesen (Abbildung 3.8 B); diese Banden mit hohem Molekulargewicht stellen möglicherweise Proteinaggregate zwischen Glykoproteinmonomer und anderen Proteinen der Probe dar. Im Gegensatz dazu konnten keine Banden in Immunoblotanalysen von MOCK infizierten Hühnerembryozellen unter Verwendung der polyklonalen anti-Glykoprotein Seren detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren ließen sich keine Banden mit den Präimmunseren in den getesteten Proben detektieren (Daten nicht gezeigt).

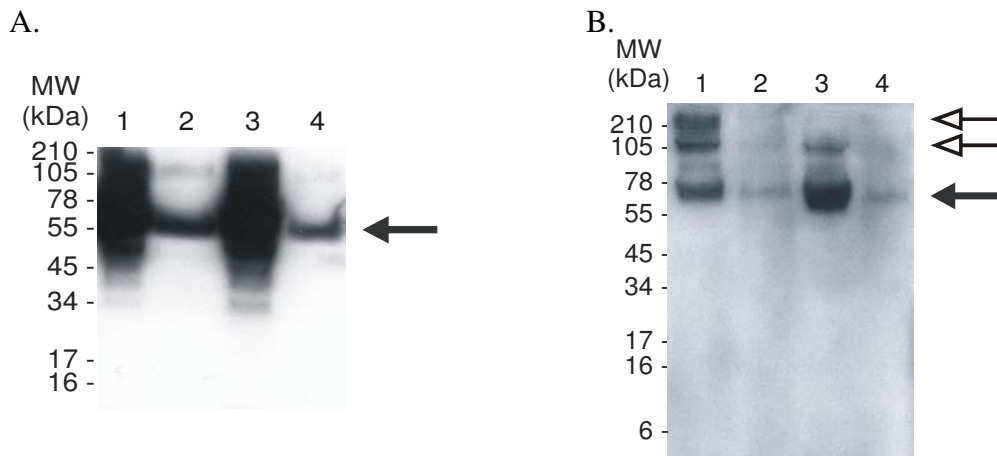


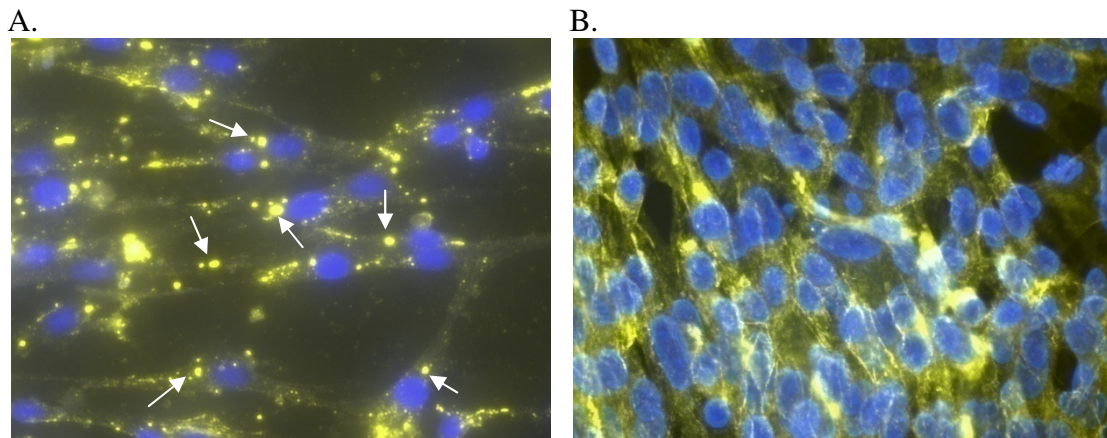
Abbildung 3.8. Einsatz der Seren gegen N und G im Immunoblot.

Eine definierte Proteinmenge (20 µg) des Viruskonzentrats der Tollwutvirusstämme FluryLEP (1) und PM 1503 (3) und der entsprechenden Impfstoffe „Rabipur“ (2) und „Rabivac“ (4) wurde in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. A. Immunoblot unter Verwendung des anti-Nukleoprotein Serums (1:20000). Der Pfeil weist auf die entsprechenden Nukleoproteinbanden. B. Immunoblot unter Verwendung des anti-Glykoprotein Serums (1:20000). Der gefüllte Pfeil weist auf die Glykoproteinmonomerbanden. Die nicht gefüllten Pfeile deuten auf weitere Banden, die durch das Serum detektiert werden. MW: Proteinmarker in Kilo-dalton (kDa).

### 3.2.4b Reaktivität der Seren in der Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Reaktivität der Seren in der indirekten Immunfluoreszenz wurden MOCK infizierte bzw. mit Tollwutvirus (Stamm CVS) infizierte BHK-21 Zellen verwendet. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde wie in Kapitel 2.2.8ab beschrieben durchgeführt. Die Seren wurden in Verdünnungsstufen eingesetzt, um eine optimale Intensität der Färbung zu erzielen. Das beste Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund wurde bei einer Verdünnung der Seren von 1:800 für die anti-Nukleoprotein-Seren und 1:400 für die anti-Glykoprotein-Seren erreicht. Sämtliche Seren führten zu einer deutlichen Markierung der infizierten Zellen (Abbildung 3.9). Das Nukleoprotein wurde in

Form intrazytoplasmatischer Einschlusskörperchen nachgewiesen (Abbildung 3.9 A). Diese Einschlusskörperchen sind typisch für das Tollwutvirus und ähneln den Negrikörperchen, die sich im Nervengewebe infizierter Tiere nachweisen lassen.



*Abbildung 3.9.* Reaktivität der polyklonalen Seren in der Immunfluoreszenz.

BHK-21 Zellen wurden mit dem Tollwutvirusstamm CVS infiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung polyklonaler Seren gegen Tollwutvirusnukleoprotein (A) und Tollwutvirusglykoprotein (B) markiert. Die Pfeile deuten auf Einschlusskörperchen. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

### 3.2.4c Virusneutralisation mit Hilfe der anti-G-Seren

Im Verlauf einer Infektion mit Tollwutvirus werden neutralisierende Antikörper gegen das Hüllglykoprotein des Virus gebildet. Diese Antikörper können z.B. im Serumneutralisationstest nachgewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung der gewonnenen Seren gegen das Glykoprotein wurden die Titer neutralisierender Antikörper im FAVN-Test nach Angaben der OIE (Kapitel 2.2.6) bestimmt. Die Titer der polyklonalen Seren betrugen 0,06 bzw. 0,11 IU/ml und sind demnach als niedrig einzustufen. Nach Angabe der OIE muss zum Schutz vor einer Tollwuterkrankung ein Antikörpertiter von mindestens

0,5 IU/ml erreicht werden. Offenbar ist die Fähigkeit der Seren zur Neutralisation sehr gering (siehe Diskussion).

### 3.3 Etablierung eines ELISAs

Eine Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand in der Quantifizierung der Proteine N und G von Tollwutvirus in den Viruskonzentraten und den entsprechenden Vakzinen. Zu diesem Zweck wurden Sandwich-ELISAs mit den charakterisierten Antiseren etabliert und die Konzentrationen der Proteine in den Proben durch Vergleich mit einer Standardkurve ermittelt. Nach Reinigung (Kapitel 2.2.7a) und Biotinylierung (Kapitel 2.2.7b) wurden die entsprechenden Antikörper als Fängerantikörper sowie als Detektionsantikörper eingesetzt. Als Standard dienten Präparationen von gereinigtem rekombinanten Nukleoprotein und Glykoprotein, die auch für die Immunisierung eingesetzt wurden. Zur Hintergrundkontrolle wurden PBS<sup>++</sup> sowie Lysat-Präparationen von MOCK infizierten SF-21 Insektenzellen verwendet (Kapitel 2.2.7c).

#### 3.3.1 Standardisierung des ELISAs

Das ELISA-Verfahren wurde wie in Kapitel 2.2.7c beschrieben durchgeführt. Zur Optimierung der ELISAs wurden Konzentrationen der einzelnen Reagenzien mit Hilfe von seriellen Verdünnungsreihen getestet.

Die Fänger- und Detektionsantikörper wurden in geometrischen 1:2 Verdünnungsreihen ab 1 µg/Well eingesetzt. Die optimale Konzentration der Fängerantikörper lag bei 100 ng/Well. Eine Konzentration der Detektionsantikörper von 500 ng/Well ergab ein starkes Signal ohne deutlichen Hintergrundanstieg (Daten nicht gezeigt).

Für Proben und für Detektionsantikörper wurden verschiedene Inkubationszeiten ausprobiert. Standardmäßig wurde eine Inkubationszeit von 1,5 h für die Durchführung des ELISAs ausgewählt. Diese Inkubationszeit konnte auf 1 h reduziert werden, ohne dass es zu einer Verschlechterung der Messergebnisse kam.

Zur Erstellung der Standardkurven wurden verschiedene Konzentrationen von gereinigten Proteinen und entsprechende Konzentrationen von Extrakten MOCK infizierter SF-21 Insektenzellen (Hintergrundkontrolle) in geometrischen 1:2-Verdünnungsreihen getestet. Bei einer Anfangskonzentration von 500 ng gereinigtem Protein/Well konnte eine Standardkurve ermittelt werden, die sich für die Berechnung des Proteingehalts in den Proben einsetzen ließ (Abbildung 3.10).

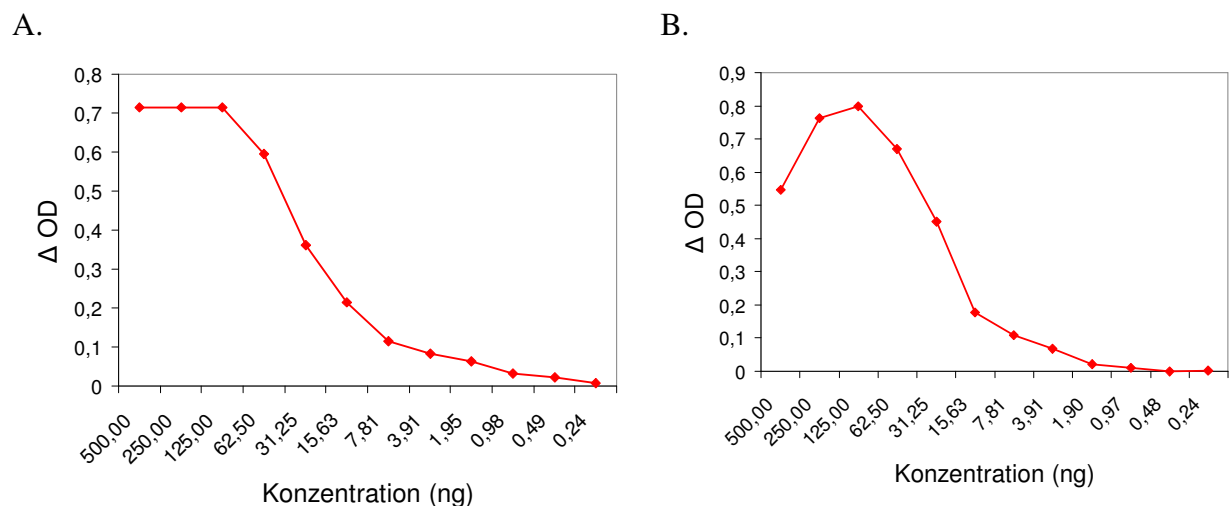


Abbildung 3.10. Darstellung einer Messkurve des Standards im ELISA für die Quantifizierung des Nukleoproteins (A) und des Glykoproteins (B) von Tollwutvirus.

Konzentration der Fängerantikörper: 100 ng/Well; Konzentration der Detektionsantikörper: 500 ng/Well. Geometrische Verdünnungsreihe des Standards bzw. der MOCK infizierten SF-21 Insektenzellen: 500-0,24 ng.  $\Delta OD$ : OD-Messwerte des Standards minus Werte der MOCK infizierten Zellen und PBS<sup>++</sup> Werte.

Nach Auswertung der gemessenen Daten erfolgte für jeden ELISA-Ansatz eine Kurvenanpassung des Standards durch eine nicht-lineare Regression (Kapitel 2.2.7d). Im Fall des Standards für die Quantifizierung des Glykoproteins wurden die Messungen bei hohen Konzentrationen nicht für die Anpassung der Kurve verwendet, da Konzentrationen über 100 ng zu abfallenden OD-Werten führten (Abbildung 3.10 B).

### **3.3.2 Qualitätsparameter des ELISAs**

#### **3.3.2a Nachweisempfindlichkeit**

Die Sensitivität (Nachweisgrenze) eines ELISAs entspricht der niedrigsten Analytkonzentration, die im Vergleich zum Hintergrund bzw. zur negativen Kontrolle einen statistisch signifikant höheren Wert angibt (Pathak, et al., 1997). Demnach stellt die Sensitivität die niedrigste Analytkonzentration mit einem Mittelwert mit zwei oder drei Standardabweichungen über dem Mittelwert des Signals einer analytfreien Probe dar.

Zur Bestimmung der Sensitivität des ELISAs wurden gereinigtes rekombinantes Nukleoprotein bzw. Glykoprotein in einer Konzentration von 500 bis 0,24 ng verwendet. Als antigenfreier Kontrollansatz wurde PBS<sup>++</sup> eingesetzt. Nach mehrfachen Messungen der verschiedenen Proben wurde die Nachweisgrenze abzüglich dreier Standardabweichungen für gereinigtes rekombinantes Nukleoprotein bei ca. 180 ng/ml und für Glykoprotein bei 30 ng/ml festgelegt.

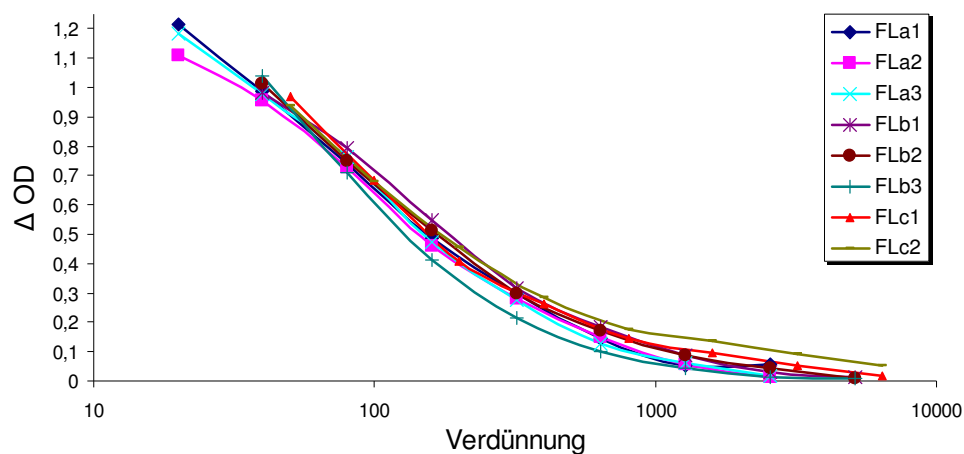
#### **3.3.2b Reproduzierbarkeit des ELISAs**

Die Intra- und Inter-Assay-Variationen zeigen den Grad der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen bei einem Testverfahren, in diesem Fall des ELISAs, an. Erhaltene Variationskoeffizienten der Intra- und der Inter-Assay-Variation unter 20 % werden als ausreichend für die Reproduzierbarkeit eines Tests ange-

sehen. Darüber hinaus werden Variationskoeffizienten bis 30 % toleriert (OIE, 2004).

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden die Intra- und Inter-Assay-Variationen anhand verschiedener eingesetzter Proben bestimmt. Die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SA) und die Variationskoeffizienten (VK) wurden aus der berechneten Proteinkonzentration ermittelt.

Die Intra-Assay-Variation wurde mittels Mehrfachbestimmung der Proben (gereinigte rekombinante Proteine, Kontrollansätze, Testproben) in einem einzigen ELISA-Durchgang analysiert. Abbildung 3.11 zeigt als Beispiel die Darstellung der Messkurven für das Nukleoprotein nach mehrmaligem Einsatz einer Testprobe und Messung mittels des Nukleoprotein-ELISAs (N-ELISA).



*Abbildung 3.11.* Darstellung der Messkurven des Nukleoproteins von Tollwutvirus.

Eine Testprobe des Viruskonzentrats des Tollwutvirusstammes FluryLEP wurde in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (a, b und c) eingesetzt und mehrfach (1, 2 und 3) in einem einzigen ELISA-Durchgang gemessen.  $\Delta OD$ : OD-Messwerte minus  $PBS^{++}$  Werte.

Die Variationskoeffizienten des ELISAs für die Quantifizierung des Nukleoproteins (N-ELISA) lagen in alle Fällen unter 20 %. Beim G-ELISA lag einer von vier Variationskoeffizienten über 20 % (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3

*Intra-Assay-Variation von N- und G-ELISA.*

	Mittelwert (µg/ml)	Standardabweichung (µg/ml)	Variationskoeffizient (%)
N-ELISA			
Probe 1	258,68	35,40	13,68
Probe 2	239,28	39,10	16,34
Probe 3	175,19	9,13	5,21
Probe 4	181,63	9,91	5,46
Probe 5	194,71	22,03	11,31
G-ELISA			
Probe 1	1,99	0,11	5,44
Probe 2	3,15	0,49	15,48
Probe 3	3,5	0,49	13,92
Probe 4	6,75	1,68	24,93

Die Inter-Assay-Variation wurde durch die Messung von Testproben in unabhängig voneinander und an verschiedenen Tagen durchgeführten ELISAs untersucht. Die Ergebnisse der Inter-Assay-Variation des N-ELISAs ergaben Variationskoeffizienten im vorgegebenen Rahmen (< 30 %). Im Fall des G-ELISAs lag einer der Werte mit 64,49 % deutlich über 30 % (Tabelle 3.4). Dabei handelte es sich jedoch um die Probe mit der geringsten Menge an Glykoprotein.



Tabelle 3.4

*Inter-Assay-Variation von N- und G-ELISA.*

	Mittelwert (µg/ml)	Standardabweichung (µg/ml)	Variationskoeffizient (%)
<b>N-ELISA</b>			
Probe 1	16,81	4,44	26,42
Probe 2	111,97	1,77	1,58
Probe 3	228,93	4,26	1,86
Probe 4	2516,55	271,44	10,79
Probe 5	230,62	46,49	20,16
<b>G-ELISA</b>			
Probe 1	4,42	0,51	11,52
Probe 2	7,76	1,87	24,16
Probe 3	1,25	0,81	64,49
Probe 4	3,12	0,05	1,59

### 3.4. Biochemische Charakterisierung der Impfstoffe „Rabipur“ und „Rabivac“

#### 3.4.1 Quantifizierung des Nukleo-/Glykoproteins in den Viruskonzentraten und in den Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“ mittels ELISA

Ein Ziel der Etablierung von ELISA-Systemen für die Quantifizierung des Tollwutvirusglykoproteins sowie des Tollwutvirusnukleoproteins ist die Entwicklung eines in-vitro-Tests zur Bestimmung der Potenz von Impfstoffen gegen Tollwut. In diesem Sinne ist die Quantifizierung des Glykoproteins besonders wichtig, da das Glykoprotein für die Induktion neutralisierender Antikörper verantwortlich ist. Zusätzlich soll der Zustand des Proteins, z.B. frei lösliches bzw. Virus-gebundenes Glykoprotein, erfasst werden. Die Form, in der das Antigen vorliegt, weist einen Einfluss auf die Potenz der Vakzine auf, wobei das freie lösliche Glykoprotein geringere Titer von neutralisierenden Antikörpern induziert (Piza, et al., 2002). Hieraus folgt, dass die Menge intakter

Viruspartikel in den Viruskonzentraten bzw. in den Vakzinen mit der Potenz der jeweiligen Präparationen korreliert. Das Nukleoprotein dient als Indikator für die Messung von intakten Partikeln in Vakzinpräparationen. Das N-Protein ist im Inneren von Virionen lokalisiert und kann durch z.B. Detergenz-Behandlung freigesetzt werden. Die Relation zwischen dem quantifizierten Nukleoprotein vor und nach Behandlung der Proben mit Detergenzien sollte Rückschlüsse auf die Menge intakter Viruspartikel in den untersuchten Proben erlauben.

Die Quantifizierung des Nukleo- und Glykoproteins in den Viruskonzentraten und den Impfstoffen wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt: (i) unter nativen Bedingungen, und zwar entweder ohne Behandlung oder nach Behandlung mit einem nicht denaturierenden Puffer (LP-GV), (ii) unter denaturierenden Bedingungen durch Inkubation mit 8 M Harnstoff (Kapitel 2.2.7ca). Nach Auswertung der gemessenen Werte und entsprechender Kurvenanpassung des Standards wurden die Proteinkonzentrationen berechnet (Kapitel 2.2.7d). Die Ergebnisse der Quantifizierung des Nukleo- bzw. Glykoproteins mittels des entsprechenden N- und G-ELISAs sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5

*Relative Konzentrationen des Nukleo- und des Glykoproteins in den Viruskonzentraten des Tollwutvirusstammes FluryLEP (Rabipur) und PM 1503 (Rabivac) und den entsprechenden Vakzinen nach Quantifizierung mittels ELISA.*

Probe	Nukleoprotein (µg/ml)	Glykoprotein (µg/ml)
<b>Viruskonzentrat</b>		
Rabipur (A)	239,28	2,41
Rabipur (B)	2119,68	3,08
Rabipur (C)	2708,48	16,8
Rabivac (A)	288,52	-
Rabivac (B)	2630,53	54,4
Rabivac (C)	2841,73	9,08
<b>Vakzine</b>		
Rabipur (A)	13,67	1,55
Rabipur (B)	113,22	1,82
Rabipur (C)	225,92	5,41
Rabivac (A)	22,4	-
Rabivac (B)	114,11	3,41
Rabivac (C)	183,62	4,78

Anmerkungen. (A): nicht behandelte Proben; (B): Proben nach Behandlung mit LP-GV Puffer; (C): Proben nach Behandlung mit denaturierendem Lysis Buffer.

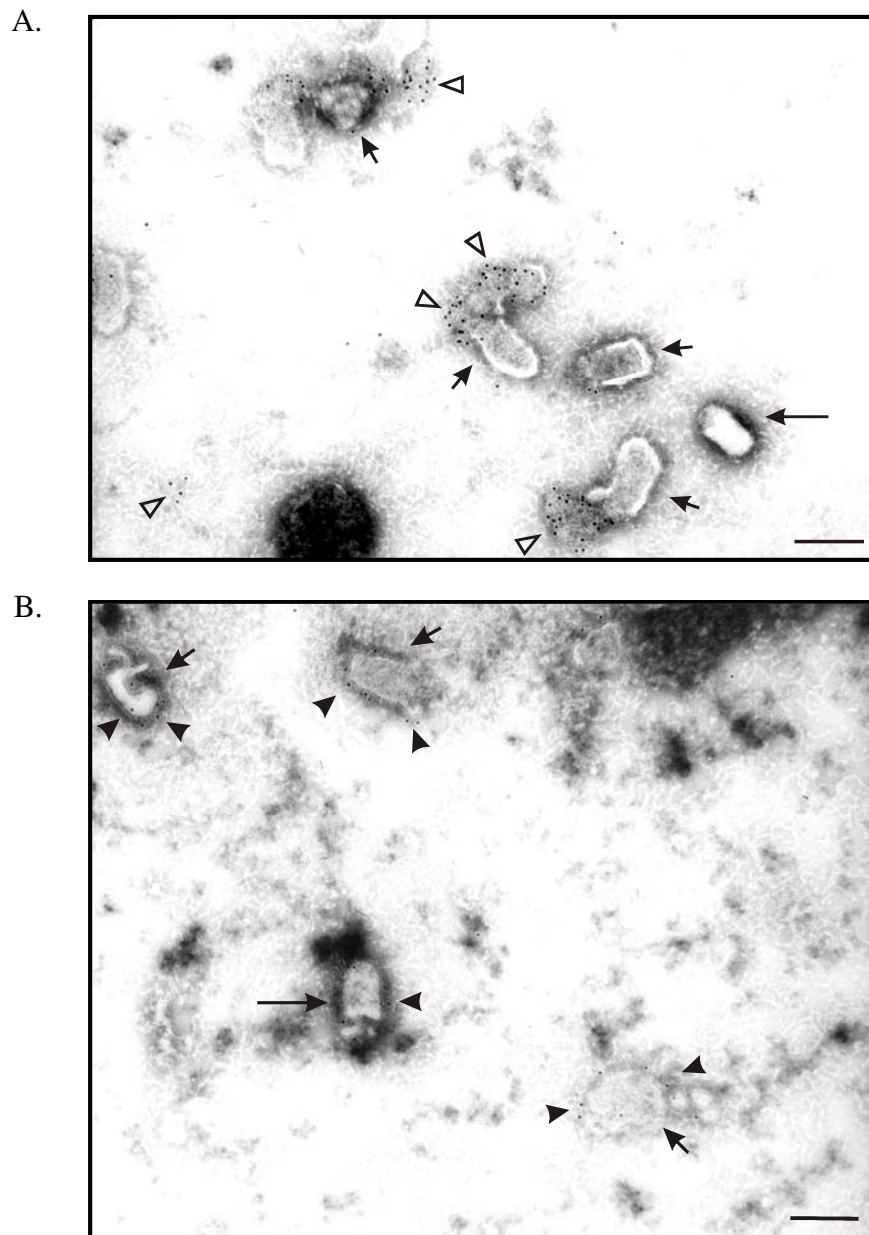
Die Relation zwischen dem quantifizierten Nukleoprotein vor und nach Behandlung der Proben wurde für die Viruskonzentrate berechnet. Nach mehreren Messungen der Proben lag die durchschnittliche Relation bei 1:9,22 für „Rabipur“ und bei 1:9,02 für „Rabivac“.

### 3.4.2 Identifizierung von Nukleo-/Glykoprotein mittels Immunelektronenmikroskopie

Mittels Immunelektronenmikroskopie in Verbindung mit Negativ-Kontrastierung (Kapitel 2.2.8b) wurde die Integrität von Tollwutviruspartikeln in den Viruskonzentraten bzw. in den Vakzinen direkt untersucht.

Tollwutvirionen zeigen eine zylindrische Form mit einer Größe von ungefähr 180x75 nm. Diese typische Morphologie von intakten Partikeln konnte in der Negativkontrastierung der Proben gezeigt werden (Abbildung 3.12).

Nach Immunogoldmarkierung wurden virales Nukleo- und Glykoprotein identifiziert. Zur Kontrolle wurden die proteinspezifischen Antikörper durch PBS ersetzt, wobei keine Markierung auftrat (Daten nicht gezeigt). Das Nukleoprotein ließ sich an defekten Viruspartikeln und in freier Form nachweisen (Abbildung 3.12 A). In der Virushülle von intakten und auch nicht intakten Partikeln wurde ausschließlich das Glykoprotein identifiziert (Abbildung 3.12 B).



*Abbildung 3.12.* Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen von Virionen im Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes FluryLEP.

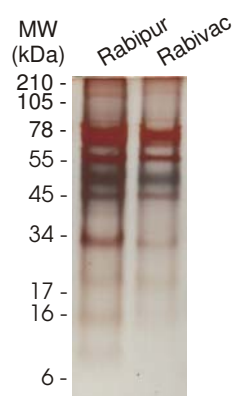
(A) Markierung des viralen Nukleoproteins mit Hilfe polyklonaler Antikörper; Nachweis mit einem Gold-gekoppelten Goat-anti-Rabbit-IgG-Antikörper (nicht gefüllte Pfeilspitze). (B) Nachweis des viralen Glykoproteins über den monoklonalen Antikörper TW-17 (Fa. Chiron Vaccines); Sekundär-Antikörper: Gold-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (gefüllte Pfeilspitze). Lange Pfeile weisen auf intakte Viruspartikel; kurze Pfeile auf defekte Viruspartikel. Balken: 200 nm.

### 3.4.3 Nachweis der Proteine in den Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“

Ein Hauptziel dieser Arbeit lag in der Identifizierung von Proteinen in den Vakzinen bzw. in den Viruskonzentraten. Hierzu wurden die Testproben mittels eindimensionaler (1-D SDS-PAGE, Kapitel 2.2.3ba) und zweidimensionaler Gelelektrophorese (2-D SDS-PAGE, Kapitel 2.2.3bb) aufgetrennt. Bei dem letztgenannten Verfahren wurden Präparationen auf 13 cm langen Immobiline® DryStrips (Fa. Amersham Biosciences) mit einem linearen (pH 4-7) oder nicht linearen pH-Gradienten (pH 3-10) isoelektrisch fokussiert (erste Dimension) und dann nach ihrem Molekulargewicht auf einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (zweite Dimension). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels Immunoblot (Kapitel 2.2.3d), N-terminaler Peptid-Sequenzierung (Kapitel 2.2.3e) oder Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS, Kapitel 2.2.3f).

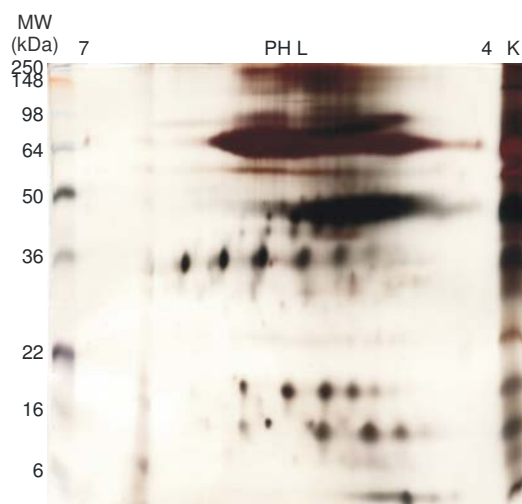
In Abbildung 3.13 sind die mit einer Silberfärbung (Kapitel 2.2.3cb) visualisierten Proteine in den Viruskonzentraten und den entsprechenden Vakzinen nach 1-D und 2-D SDS-PAGE dargestellt. Die 1-D SDS-PAGE zeigte das Vorhandensein mehrerer Proteinbanden mit unterschiedlichen Molekularmassen (Abbildung 3.13 A). In der 2-D SDS-PAGE wurden mehr als 50 distinkte Proteinspots mit verschiedenen Molekulargewichten bzw. isoelektrischen Punkten nachgewiesen. Proteinspots in den Vakzinen zeigten im Vergleich zu denen in den Viruskonzentraten einen etwas niedrigeren pI (Abbildung 3.13 B). Die Vakzinen beinhalten modifizierte Gelatine (Haemaccel™), die zu einer diffusen Färbung im oberen rechten Quadranten des 2-D Gels führte (Abbildung 3.13 B2 und B4).

A.

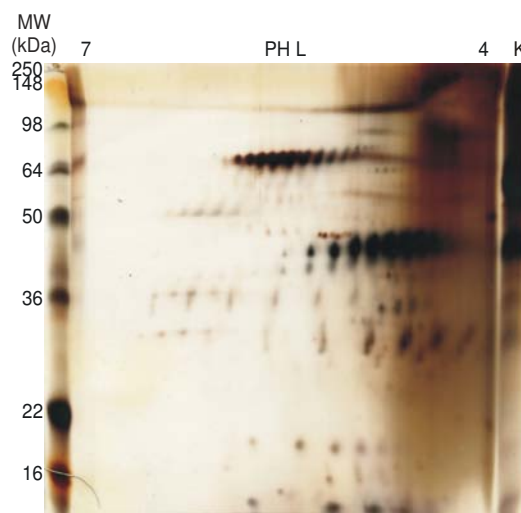


B.

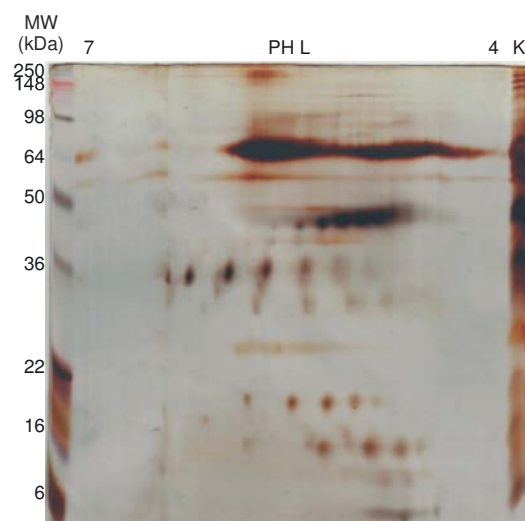
1.



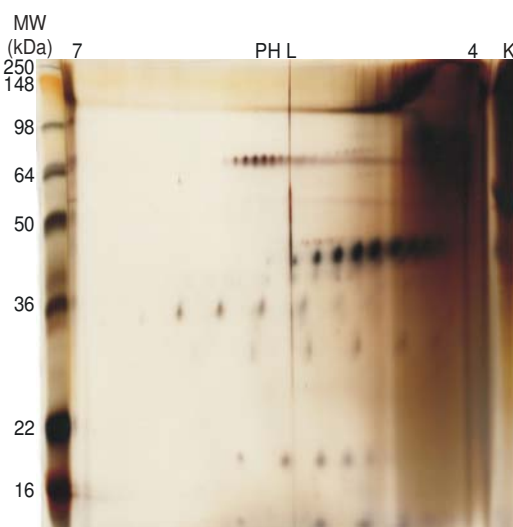
2.



3.



4.



*Abbildung 3.13.* Silberfärbung von Viruskonzentraten der Tollwutvirustämme Flury-LEP (1) und PM 1503 (3) und den entsprechenden Vakzinen „Rabipur“ (2) und „Rabivac“ (4).

A. 1-D 10 %-ige SDS-PAGE beider Vakzinen. B. 2-D SDS-PAGE von untersuchten Proben auf Immobiline<sup>®</sup> DryStrips (Fa. Amersham Biosciences) mit einem linearen pH Gradienten von pH 4-7 isoelektrisch fokussiert (erste Dimension) und einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (zweite Dimension).

K: Kontrollspur für die zweite Dimension. MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

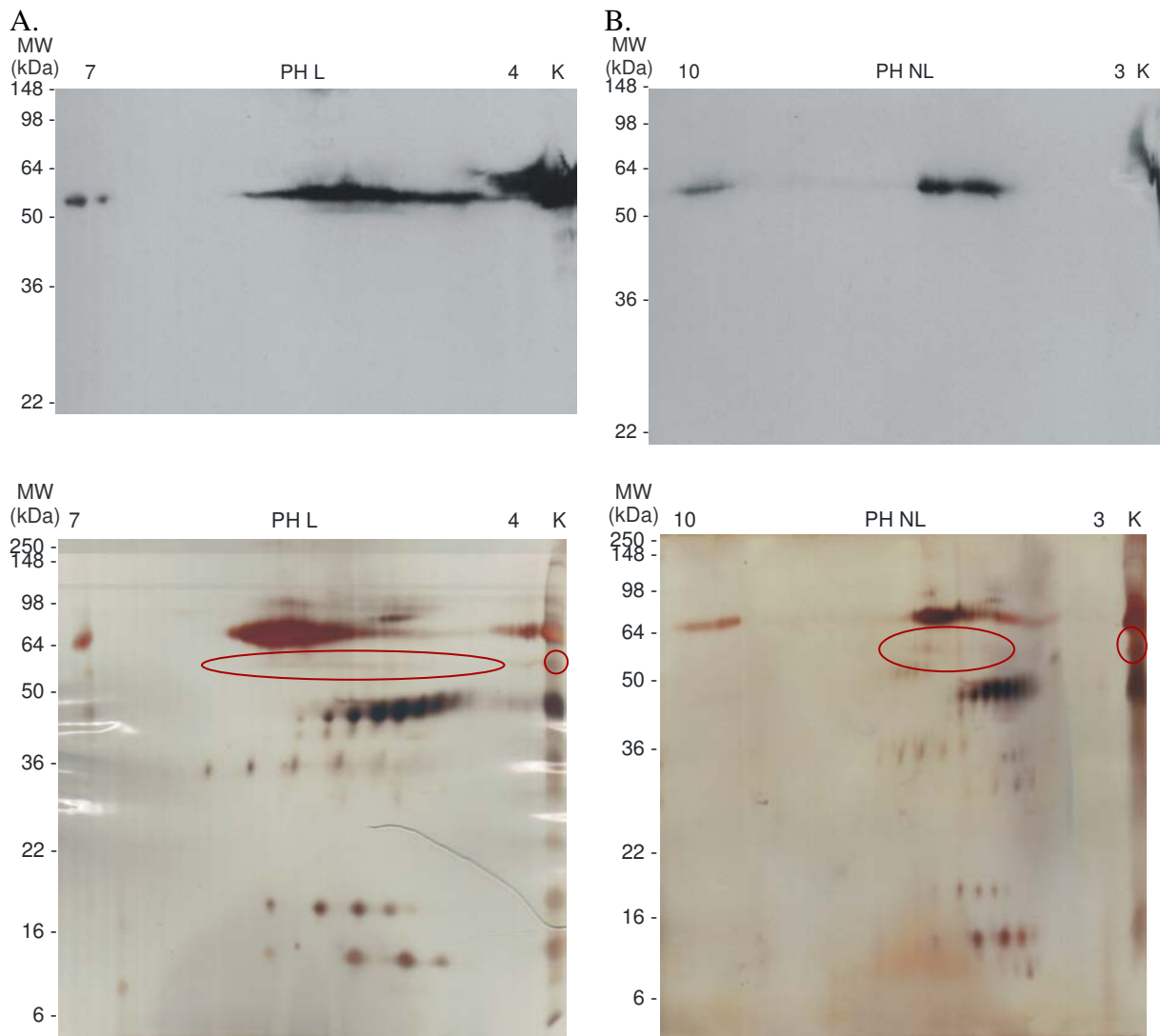


### 3.4.3a Identifizierung viraler Proteine mittels Immunoblot

Zur Identifizierung viraler Proteine im Immunoblot wurden die gewonnenen polyklonalen Seren gegen das Nukleo- bzw. Glykoprotein sowie polyklonale Seren gegen das Matrix- und das Largeprotein verwendet.

Die polyklonalen Antikörper gegen das Matrixprotein und gegen das Largeprotein des Tollwutvirus wurden von Dr. K. K. Conzelmann und Dr. Stefan Finke zur Verfügung gestellt.

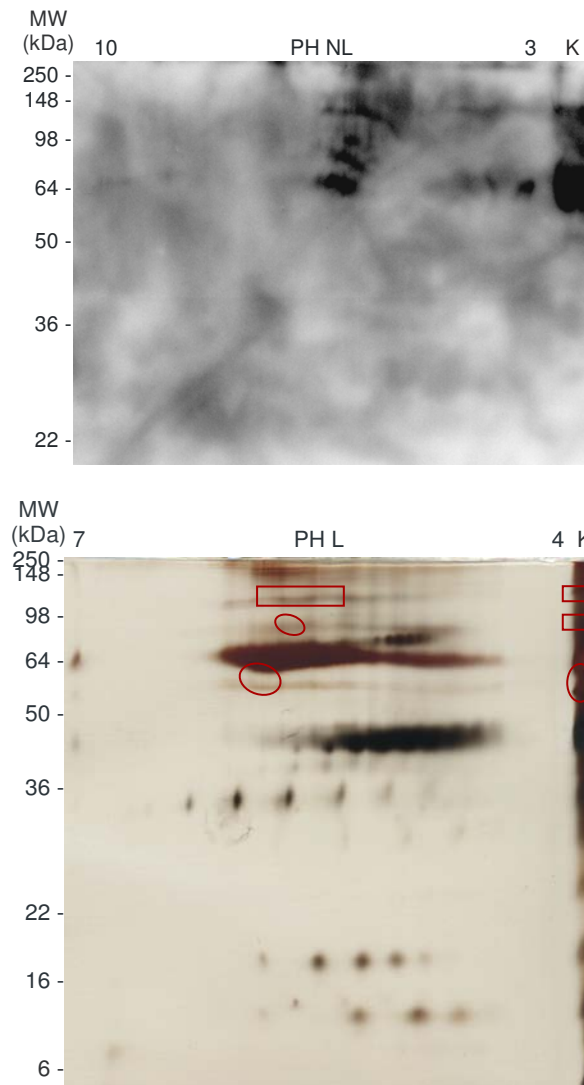
Mit Hilfe eines Antiserums wurde eine prominente Bande von ca. 55 kDa mit isoelektrischem Punkt zwischen 4,3-6,2 in den Viruskonzentraten und der gleichen Proteingröße, aber leicht niedrigerem pI Bereich, in den Vakzinen als Nukleoprotein identifiziert (Abbildung 3.14).



*Abbildung 3.14.* Identifizierung des Tollwutvirusnukleoproteins im Viruskonzentrat (Flury-LEP) (A) und in der entsprechenden Vakzine „Rabipur“ (B) im Immunoblot nach 2-D SDS-PAGE .

Mittels 2-D SDS-PAGE wurden die Proteine auf 13 cm langen Immobiline<sup>®</sup> DryStrips (Fa. Amersham Biosciences) mit einem linearen pH Gradienten von pH 4-7 (A) bzw. mit einem nicht linearen pH Gradienten von 3-10 (B) isoelektrisch fokussiert (erste Dimension) und nach ihrem Molekulargewicht auf einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (zweite Dimension). Proteine im Gel wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert oder Silber gefärbt. Oben: Immunoblots unter Verwendung des anti-Nukleoprotein Serums. Unten: korrespondierende Silberfärbungen. Die Markierung zeigt die Lokalisation der Nukleoproteinbande nach Silberfärbung. K: Kontrolle. MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

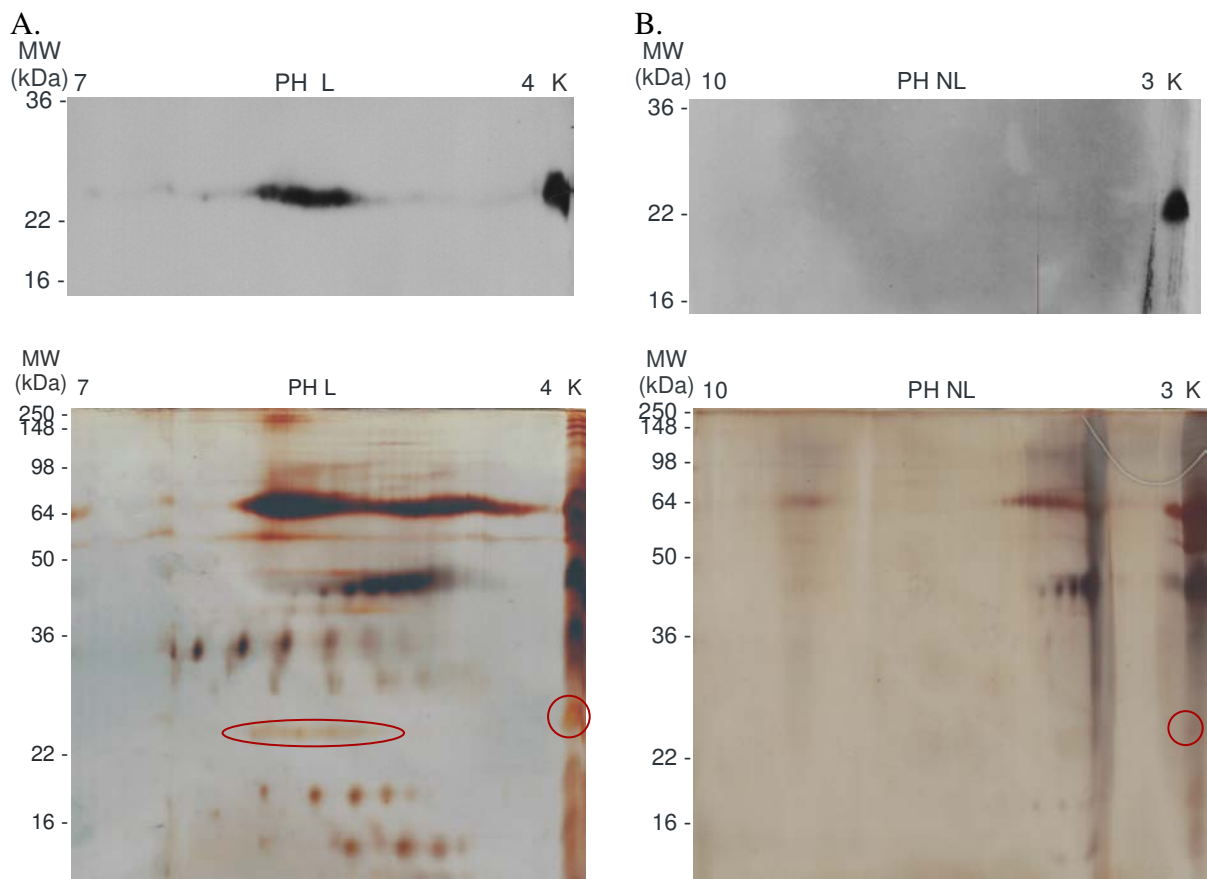
Als Glykoprotein wurden ein Proteinspot von ca. 67 kDa und weitere kleinere Proteinspots mit höherem Molekulargewicht (ca. 78, 100, 130 und 230 kDa) identifiziert. Die Spots wurden in leicht unterschiedlichen isoelektrischen Punktbereichen (pI 5,7-6,9) lokalisiert (Abbildung 3.15).



*Abbildung 3.15.* Identifizierung des Tollwutvirusglykoproteins im Viruskonzentrat (FluryLEP) im Immunoblot nach 2-D SDS-PAGE .

Oben: Immunoblot unter Verwendung des anti-Glykoprotein-Serums. Unten: Silberfärbung der entsprechenden Probe. Die Markierung zeigt die Lokalisation der Glykoproteinspots nach Silberfärbung. K: Kontrolle. pH L: linearer pH Gradient (Bereich 4-7). pH NL: nicht linearer pH Gradient (Bereich 3-10). MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

Unter Verwendung des polyklonalen Serums gegen das Matrixprotein wurden im Viruskonzentrat eine deutliche Bande und einige Proteinspots von ungefähr 25 kDa im pI Bereich 4,7-6,0 als Matrixprotein nachgewiesen (Abbildung 3.16 A). In den Vakzinen ließ sich dieses Protein nach 2-D SDS-PAGE nicht nachweisen (Abbildung 3.16 B).



*Abbildung 3.16.* Identifizierung von Tollwutvirusmatrixprotein im Viruskonzentrat (PM 1503) (A) und in der entsprechenden Vakzine „Rabivac“ (B) im Immunoblot nach 2-D SDS-PAGE .

Oben: Immunoblots unter Verwendung des anti-Matrixprotein Serums. Unten: korrespondierende Silberfärbungen. Die Markierung weist auf die Lokalisierung der entsprechenden Matrixproteinspots nach Silberfärbung. K: Kontrolle. pH L: linearer pH Gradient (Bereich 4-7). pH NL: nicht linearer pH Gradient (Bereich 3-10). MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

Abschließend konnte unter Einsatz des polyklonalen Serums gegen das Largeprotein eine Bande von ca. 190 kDa identifiziert werden. In der 2-D SDS-PAGE wurde ein Protein in diesem Molekularbereich und mit einem pI von 5,2-5,8 nur sehr schwach nachgewiesen (Abbildung 3.17).

#### **3.4.3b Identifizierung von Proteinen mittels N-terminaler Peptid-Sequenzierung**

Die Identifizierung weiterer Proteine erfolgte durch N-terminale Peptid-Sequenzierung (Kapitel 2.2.3e). Es wurden vier Proteinspots mit unterschiedlichen Molekulargewichten (9, 18, 36 und 90 kDa) bzw. isoelektrischen Punkten (5,4; 5,3; 6,2 und 4,8) aus dem Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes Flury-LEP ausgewählt (Abbildung 3.18 A). Die Sequenzierung des N-Terminus der selektierten Proteinspots wurde im Wittmann Institute of Technology and Analysis of Biomolecules (WITA GmbH, Deutschland) durchgeführt. Datenbankrecherchen (NCBI und Swiss-Prot Database) ergaben, dass die Sequenzen der Proteinspots mit einem Molekulargewicht von 9, 18 und 36 kDa sämtlich Haptoglobin zugeordnet werden konnten (Abbildung 3.18 B). Der Proteinspot von ca. 90 kDa ließ sich nicht eindeutig identifizieren. Ein Grund dafür war die geringe Menge an Protein in dem ausgeschnittenen Spot. Weiterhin legte das Sequenzergebnis nach, dass der Spot unterschiedliche Proteine enthielt (Abbildung 3.18 B).

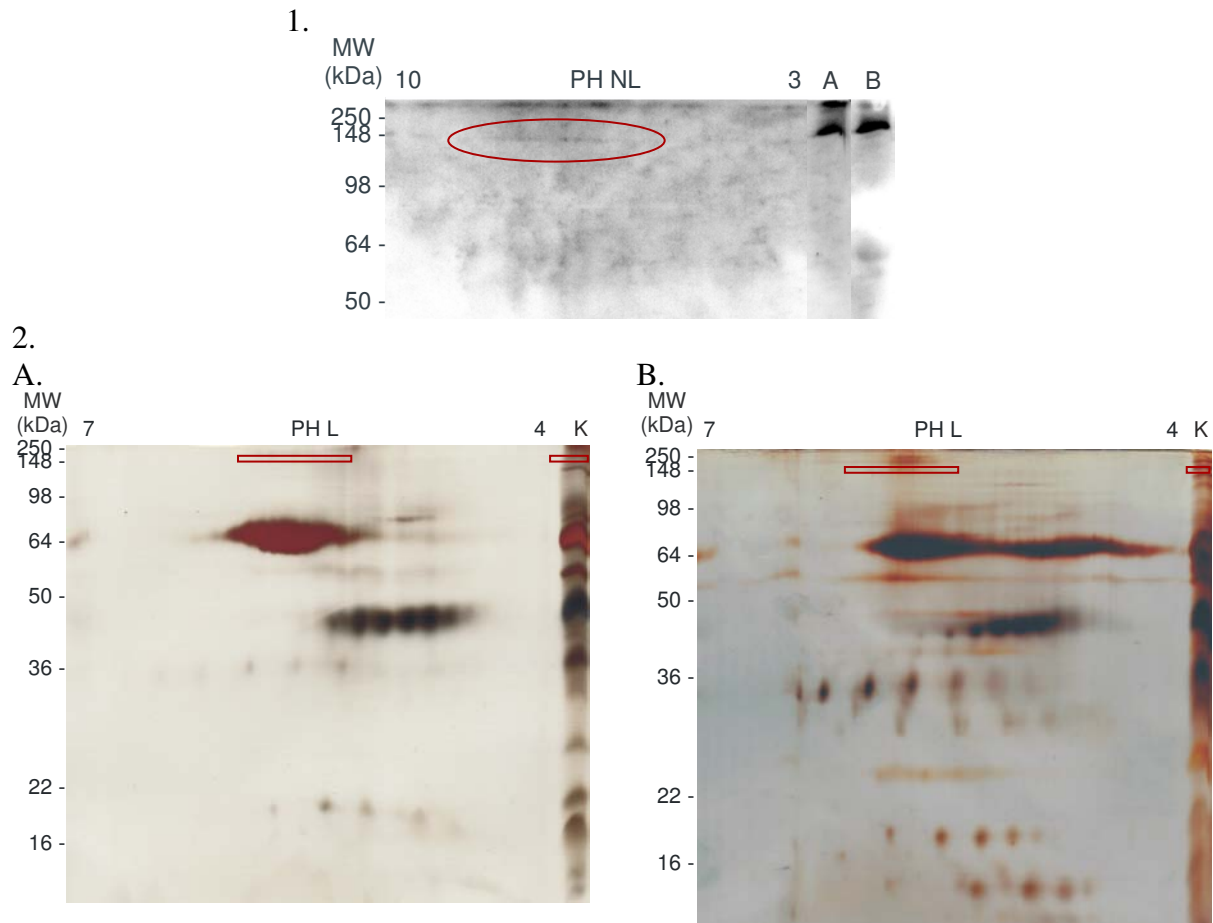


Abbildung 3.17. Identifizierung von Tollwutviruslargeprotein in den Viruskonzentraten.

1. Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes PM 1503. A: Probe des Viruskonzentrates des Tollwutvirusstammes PM 1503 (nur in der zweiten Dimension aufgetrennt). B: Probe des Viruskonzentrates des Tollwutvirusstammes FluryLEP (nur in der zweiten Dimension aufgetrennt). 2. Lokalisierung der entsprechenden Proteinbande in der Silberfärbung der Viruskonzentrate der Tollwutvirusstämme FluryLEP (A) und PM 1503 (B). K: Kontrolle. pH L: linearer pH Gradient (Bereich 4-7). pH NL: nicht linearer pH Gradient (Bereich 3-10). MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

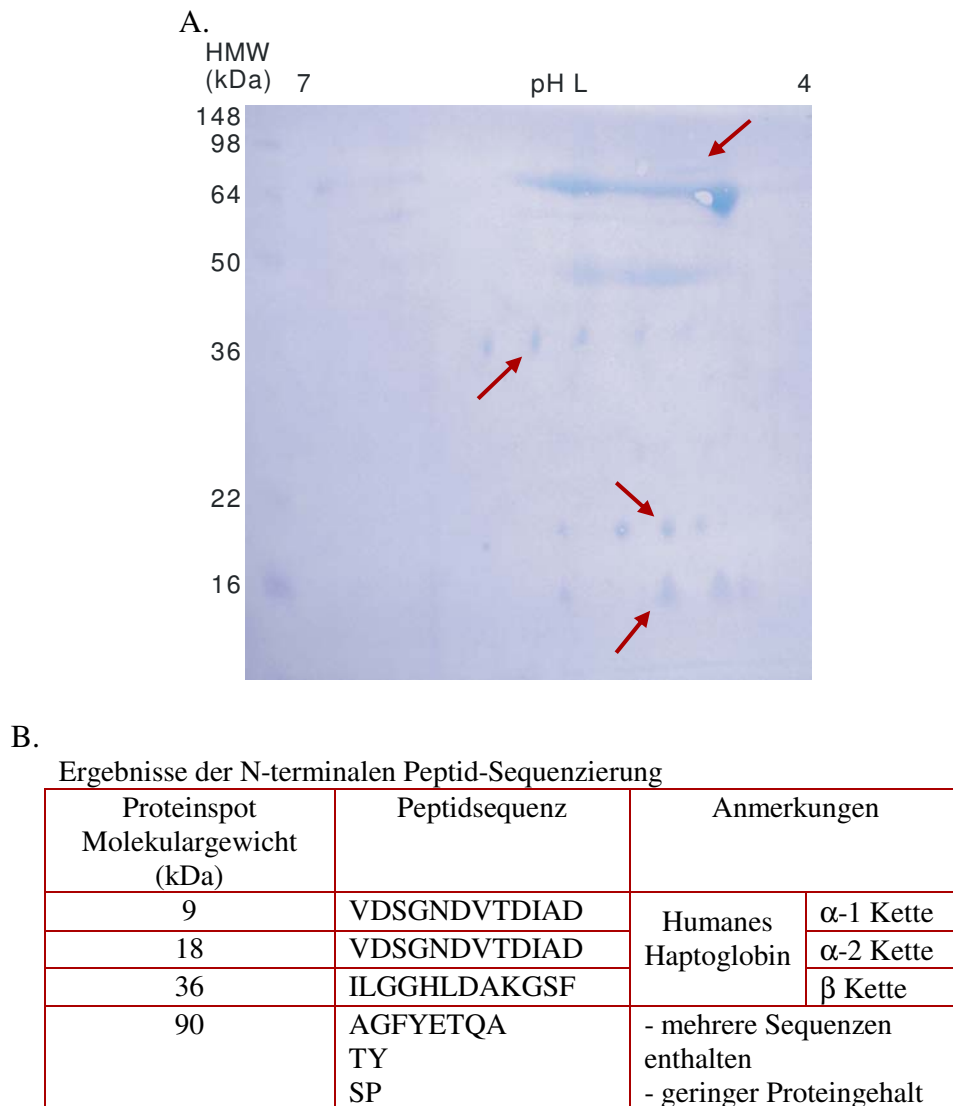


Abbildung 3.18. Identifizierung von Proteinspots durch N-terminale Peptid-Sequenzierung.

A. Proteine aus dem Viruskonzentrat des Tollwutvirusstamms FluryLEP wurden mittels 2-D SDS-PAGE auf 13 cm langen Immobiline® DryStrips (Fa. Amersham Biosciences) mit einem linearen pH Gradienten (pH L) von pH 4-7 isoelektrisch fokussiert (erste Dimension) und nach ihrem Molekulargewicht auf einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (zweite Dimension). Proteine im Gel wurden mit Hilfe des Nasstransfer-Verfahrens auf eine PVDF-Membran transferiert und durch eine Coomassie R-250-Färbung sichtbar gemacht. Die Pfeile weisen auf die selektierten Proteinspots. MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa). B. Ergebnisse der Sequenzierung.

### 3.4.3c Identifizierung nicht viraler Proteine mittels Immunoblot

Zur Vermehrung von Tollwutvirus wird Kulturmedium unter Zusatz von humanem Albumin verwendet (Barth und Franke, 1996; Branche, 1996). Nach Coomassie- bzw. Silberfärbung von Gelen der untersuchten Proben konnte ein deutlicher Proteinspot mit einem Molekulargewicht von ca. 69 kDa identifiziert werden. Daher wurde die Anwesenheit dieses nicht viralen Proteins in den Viruspräparationen vermutet. Dieser Proteinspot wurde unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen Albumin im Immunoblot eindeutig identifiziert (Abbildung 3.19 A).

Die Identifizierung mehrerer Proteinspots als Haptoglobin über die N-terminale Sequenzierung ließ die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen humanes Haptoglobin im Immunoblot vielversprechend erscheinen, um eventuell weitere Spots dieses Proteins nachzuweisen.

Ein deutlicher Spot von ca. 45 kDa mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4,3-5,4 und mehrere Gruppen von Proteinspots von ca. 9, 18, 32, 36 und 43 kDa in unterschiedlichen isoelektrischen Punktbereichen wurden mittels Immunoblot von 2-D Gelen als Haptoglobin identifiziert (Abbildung 3.19 B).



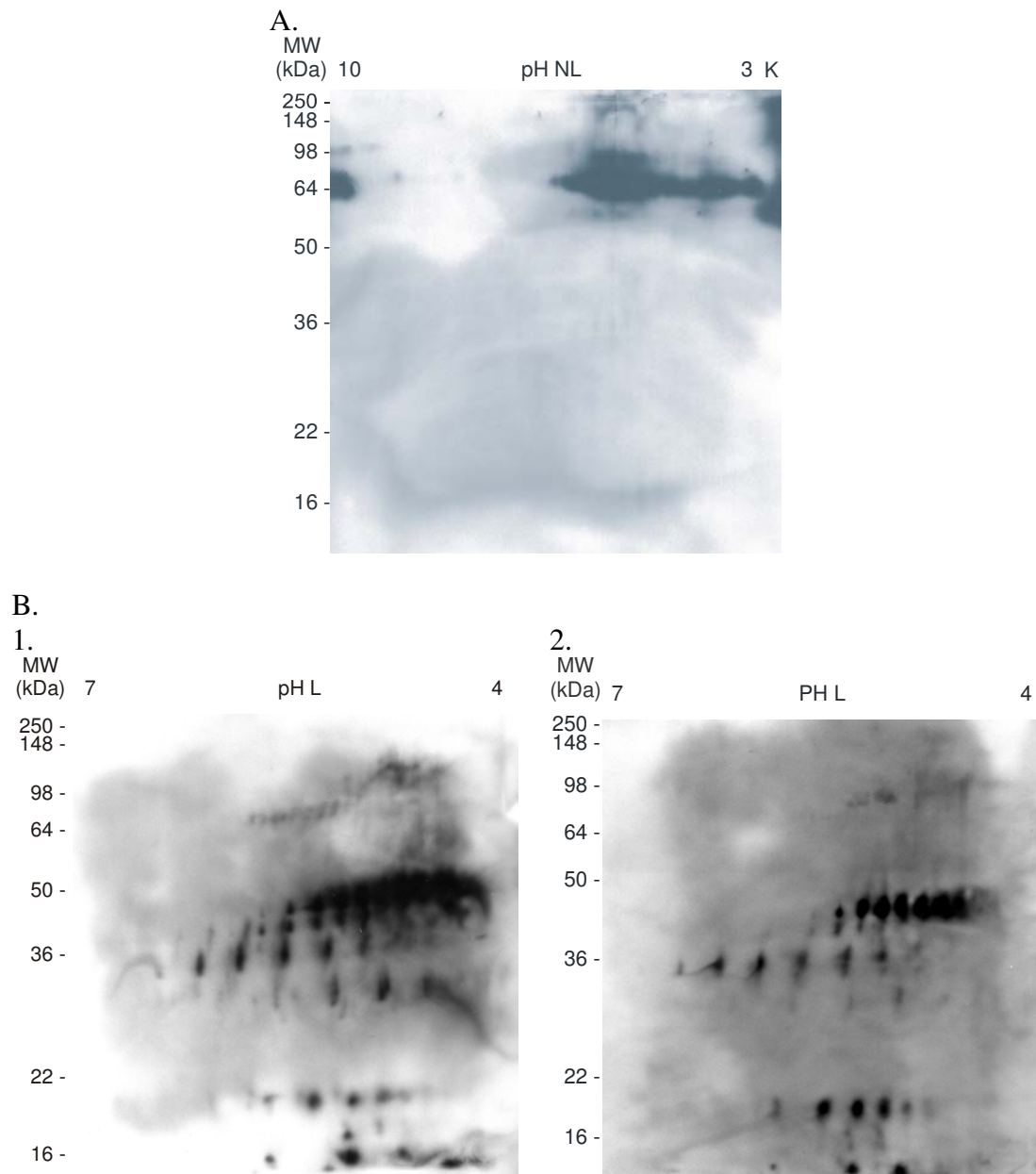


Abbildung 3.19. Identifizierung nicht viraler Proteine im Immunoblot.

A. Analyse des Viruskonzentrates des Tollwutvirusstammes FluryLEP unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen Albumin. B. Analysen der Vakzinen „Rabipur“ (1) und „Rabivac“ (2) unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen Haptoglobin. K: Kontrolle. pH L: linearer pH Gradient (Bereich 4-7). pH NL: nicht linearer pH Gradient (Bereich 3-10). MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

#### 3.4.3d Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF MS

Um noch nicht identifizierte Proteinspots zu analysieren, wurde die MALDI-TOF MS (Kapitel 2.2.3f) eingesetzt.

Dabei wurden das Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes FluryLEP und die entsprechende Vakzine als Ausgangsmaterial ausgewählt. Nach Auftrennung der Proteine mittels 2-D SDS-PAGE wurden diese entweder mit Coomassie Blue R-250 oder mit der Silberfärbung nach Shevchenko (Shevchenko, et al., 1996) gefärbt. Noch nicht identifizierte Proteinspots wurden zur Analyse ausgeschnitten (Abbildung 3.20). Die MALDI-TOF MS-Analysen erfolgten im Institut für Biochemie, Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Giessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Ein Proteinspot von ca. 40 kDa mit einem pI 4,8-5,0 (C-40b) konnte als Tollwutvirusphosphoprotein identifiziert werden. Somit ließen sich alle viralen Proteine in den Viruskonzentraten nachweisen. Vier zusätzliche nicht virale Proteine wurden als Hemopexin, Actin, Alpha-1b-Glykoprotein und Afamin identifiziert. Unter den ausgewählten Spots konnte auch Haptoglobin nachgewiesen werden (Tabelle 3.6).

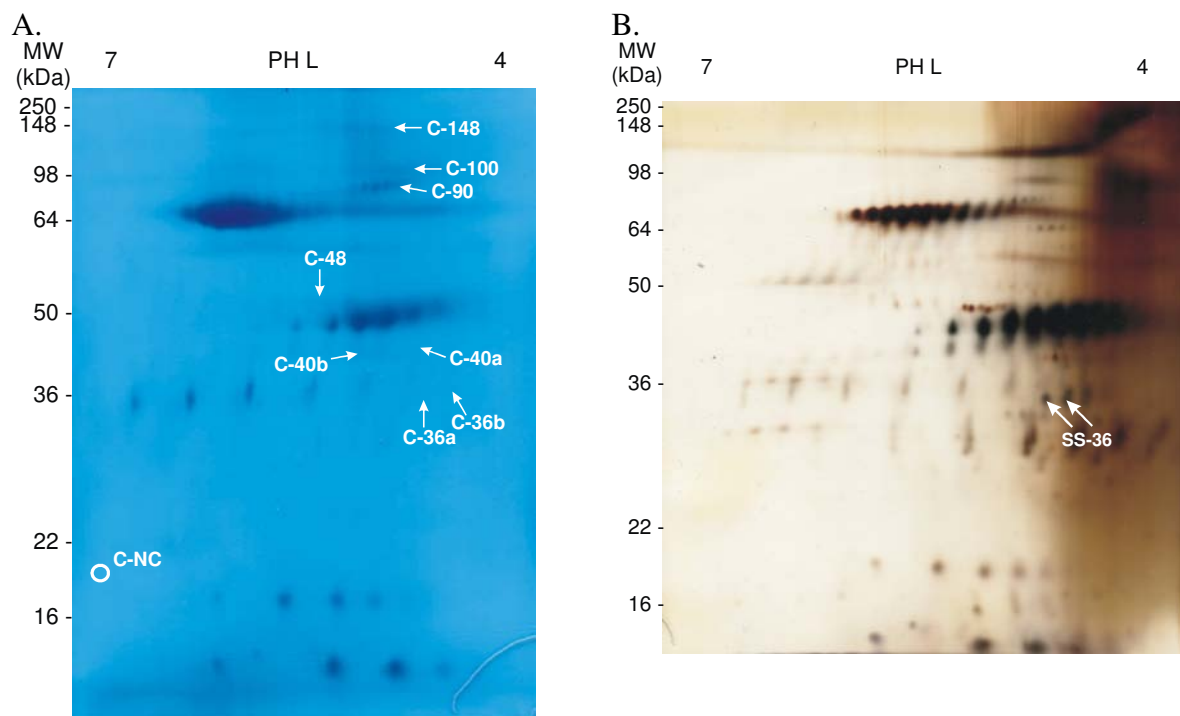


Abbildung 3.20. Selektion der Proteinspots zur Analyse mittels MALDI-TOF MS.

Nach Auftrennung von Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes FluryLEP (A) und des entsprechenden Impfstoffes „Rabipur“ (B) durch 2-D SDS-PAGE wurden die Proteine in den Gelen mit Coomassie Blue R-250 bzw. Silber (Shevchenko, et al., 1996) gefärbt. Die Pfeile weisen auf die selektierten Proteinspots, welche entsprechend ihrem Molekulargewicht benannt wurden. C-: Coomassie-Färbung; SS-: Silberfärbung; C-NC: negative Kontrolle. pH L: linearer pH Gradient (Bereich 4-7). MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

### 3.4.3e Zusammenfassung der Identifizierung von Proteinen in den Viruskonzentraten der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 sowie in den entsprechenden Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“

Unter Verwendung verschiedener biochemischen Verfahren konnte die Mehrzahl der in den untersuchten Proben enthaltenen Proteine erfolgreich identifi-

ziert werden. Zur Proteinidentifizierung wurden hauptsächlich Viruskonzentratproben verwendet, insbesondere das Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes FluryLEP. Schwerpunkt der Untersuchungen war der Impfstoff „Rabipur“, da der Impfstoff „Rabivac“ (aus Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes PM 1503 erstellt) seit dem Jahr 2006 nicht mehr erhältlich und somit nicht mehr von aktueller Bedeutung ist.

Tabelle 3.6

*Mittels MALDI-TOF MS Analysen identifizierte Proteine.*

Probe	Datenbankrecherchen (MASCOT Programm)		Anmerkungen
	Protein	Genbank-Zugangsnummer	
C-148	Hemopexin	CAA26382	I. Serum-Glykoprotein (Hvidberg, et al., 2005; Takahashi, et al., 1985)
	Haptoglobin	AAH70299	II. Plasma-Glykoprotein (Tseng, et al., 2004; Wicher und Fries, 2004)
C-100	Afamin	NP 001124	III. Plasma-Glykoprotein (Jerkovic, et al., 2005; Lichenstein, et al., 1994)
C-90	Haptoglobin	AAH70299	Siehe II.
	Alpha-1B-Glycoprotein	P04217	IV. Plasmaprotein (Ishioka, et al., 1986)
C-48	Hemopexin	CAA26382	Siehe I.
	Actin	AAH12854	V. Strukturprotein der eukaryotischen Zellen, Bestandteil des Zytoskeletts (Pollard und Earnshaw, 2002)
C-40a	Haptoglobin	AAH70299	Siehe II.
C-40b	Haptoglobin	AAH70299	Siehe II.
	Phosphoprotein– Rabies Virus	AAZ07887	VI. Bestandteile des Tollwutvirus Nukleokapsids (Eriguchi, et al., 2002; Toriumi, et al., 2004)
C-36a	Haptoglobin	AAH70299	Siehe II.
C-36b	Hemopexin	AAH05395	Siehe I.
SS-36	Haptoglobin	AAH70299	Siehe II.
	Hemopexin	AAH05395	Siehe I.

Die in den Viruskonzentraten und den entsprechenden Vakzinen identifizierten Proteine sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7

*Identifizierte Proteine in den Viruskonzentraten der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 sowie in den entsprechenden Impfstoffen „Rabipur“ und „Rabivac“.*

Protein	Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes FluryLEP	Impfstoff Rabipur	Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes PM 1503	Impfstoff Rabivac
<b>Tollwutvirusproteine</b>				
Glykoprotein	IB	IB	IB	IB
Nukleoprotein	IB	IB	IB	IB
Phosphoprotein	MS	-	-	-
Matrixprotein	IB	IB	IB	IB
Largeprotein	IB	-	IB	-
<b>Nicht virale Proteine</b>				
Haptoglobin	IB, PS, MS	IB	IB	IB
Albumin	IB	IB	IB	IB
Afamin	MS	-	-	-
Alpha-1B-Glykoprotein	MS	-	-	-
Actin	MS	-	-	-
Hemopexin	MS	MS	-	-

*Anmerkungen.* Identifizierung der Proteine mittels: IB: Immunoblot; PS: N-terminaler Peptid-Sequenzierung; MS: MALDI-TOF MS. -: nicht nachgewiesen.

Sämtliche viralen Proteine wurden in dem Viruskonzentrat des Tollwutvirusstammes FluryLEP identifiziert, die meisten von diesen auch in anderen Proben. Nach 2-D SDS-PAGE konnten diese Proteine in verschiedenen Isoformen und anhand unterschiedlicher pI-Werte lokalisiert werden (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8

*Relative Molekulargewichte und pI-Werte der identifizierten Tollwutvirusproteine.*

<b>Tollwutvirusprotein</b>	<b>~ Molekulargewicht (kDa)</b>	<b>~ pI-Werte</b>
Glykoprotein	67	5,7-6,9
	* { 78	
	100	
	130	
	230	
Nukleoprotein	57	4,3-6,2
Phosphoprotein	40	4,9
Matrixprotein	25	4,7-6,0
Largeprotein	190	5,2-5,8

\* Spots mit verschiedenen Proteingrößen wurden unter Verwendung von einem polyklonalen Serum sowie einem monoklonalen Antikörper gegen das virale Glykoprotein nachgewiesen (siehe Diskussion).

### 3.5 Gewinnung von Tollwutviruskonzentraten und deren Charakterisierung

Über die Identifizierung von Proteinen in den Viruskonzentraten und in den Vakzinen ließ sich nachweisen, dass es sich bei der Mehrzahl der nicht viralen Proteine um Serumproteine handelt. Um zu untersuchen, wie die Verwendung von Zellkulturmedium unter Zusatz von FBS den Proteinhalt in einer gereinigten Virussuspension beeinflusst, wurde Tollwutvirusstamm FluryLEP in Zellkulturmedium mit oder ohne FBS vermehrt, gereinigt und mittels 2-D SDS-PAGE analysiert.

#### 3.5.1 Vermehrung von Tollwutviren

Zur Vermehrung von Tollwutviren (Kapitel 2.2.2gb) wurden BHK-21 Zellen verwendet und mit den Virusstämmen CVS oder FluryLEP infiziert.

Die Kinetik der Virusreplikation wurde unter Einsatz verschiedener Virusdosen (MOI 0,1 oder 0,5) des Virusstammes CVS sowie Kulturmedium ohne oder mit FBS (5 % oder 10 %) untersucht. Der Virustiter (Kapitel 2.2.2h) wurde nach 48, 72 und 96 h post-Infektion (p.i.) bestimmt.

Zwischen den Virustitern der zur Verfügung stehenden Virussuspensionen konnten nur geringe Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9

*Vermehrung von Tollwutviren in Zellkultur.*

	Virustiter (log TCID <sub>50</sub> /ml)					
	48 h p.i.		72 h p.i.		96 h p.i.	
	MOI 0,1	MOI 0,5	MOI 0,1	MOI 0,5	MOI 0,1	MOI 0,5
Ohne FBS	7,55	7,8	7,55	7,05	7,55	7,3
5 % FBS	7,3	7,8	8,3	7,3	7,3	8,3
10 % FBS	7,8	8,05	7,3	7,05	8,3	8,05

*Anmerkungen.* Virus: Tollwutvirusstamm CVS. Zellen: BHK-21

### 3.5.2 Reinigung von Tollwutviren

Zur Reinigung von Tollwutviren wurde der Virusstamm FluryLEP in Kulturmedium ohne FBS (FL<sup>-</sup>) oder mit 10 % FBS (FL<sup>+</sup>) vermehrt und durch einen 10-60 %-igen Saccharose-Stufengradienten (Kapitel 2.2.2gb) gereinigt. Bei beiden Ansätzen war eine Bande in einem Konzentrationsbereich von 36 % Saccharose sichtbar. Mehrere Fraktionen wurden genommen und mittels einer Silberfärbung nach 1-D SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.21). Die jeweilige Fraktion mit sichtbarer Virusbande im Gradienten zeigte in der Silberfärbung Banden mit verschiedenen Molekulargewichten, die dem Proteinmuster der Strukturproteine von Tollwutvirus in 1-D SDS-PAGE entsprechen (Abbildung 3.21).





### 3.5.3 Charakterisierung der Tollwutviruskonzentrate FL<sup>-</sup> bzw. FL<sup>+</sup>

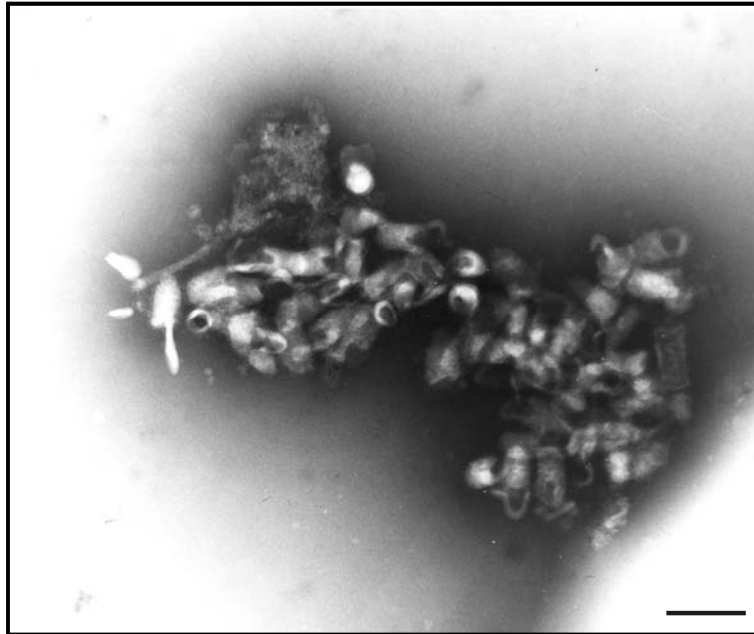
#### 3.5.3a Elektronenmikroskopische Charakterisierung der FL<sup>-</sup> bzw. FL<sup>+</sup>

Mittels Elektronenmikroskopie wurden die aus FL<sup>-</sup> bzw. FL<sup>+</sup> gereinigten sichtbaren Virusbanden untersucht, um zu überprüfen, inwieweit die Proben intakte Virionen enthielten. Mit Hilfe der Negativkontrastierung mit 2 %-igem Methy-laminwolframat konnte gezeigt werden, dass sowohl morphologisch intakte als auch defekte Partikel in beiden Ansätzen präsent waren (Abbildung 3.22).

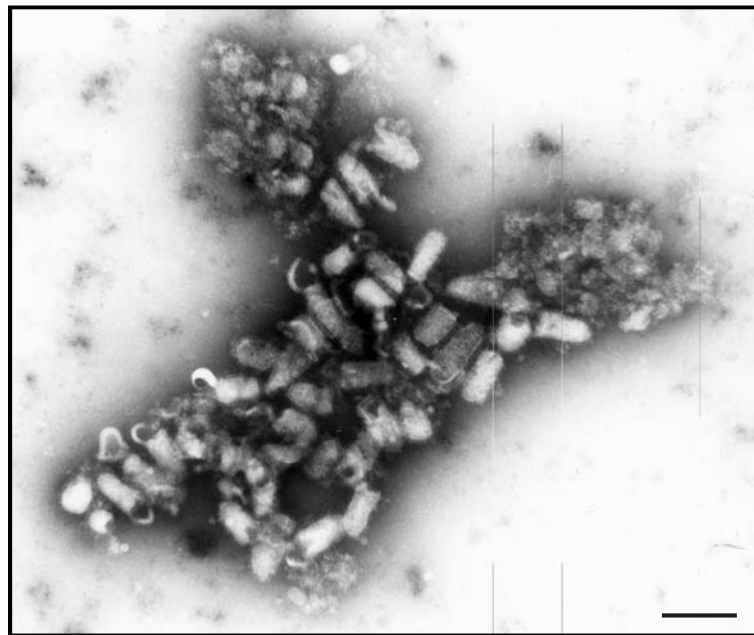
#### 3.5.3b Charakterisierung der FL<sup>-</sup> bzw. FL<sup>+</sup> mittels 2-D SDS-PAGE

Die Fraktionen, die eine sichtbare Virusbande enthielten, wurden durch 2-D SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt (Abbildung 3.23). Der Vergleich der Proteinmuster der FL<sup>-</sup> bzw. FL<sup>+</sup> zeigte einige Unterschiede. Im Proteinmuster von FL<sup>-</sup> zeigten sich an Position a Proteinspots, die im Silber gefärbten Gel von FL<sup>+</sup> nicht zu finden waren (Abbildung 3.23 A). Im Gegensatz dazu waren ausschließlich in der Präparation FL<sup>+</sup> Proteinspotssets an Positionen b, c, d, e und f nachweisbar (Abbildung 3.23 B).

A.



B.



*Abbildung 3.22.* Elektronenmikroskopische Aufnahme der gereinigten Tollwutviruspartikel aus  $FL^-$  (A) und  $FL^+$  (B) nach Negativkontrastierung.

Proben aus den nach Dichtegradient sichtbaren Virusbanden ( $FL^-$  und  $FL^+$ ) wurden mit 2 %-igem Paraformaldehyd fixiert, an Trägernetzchen adsorbiert und mit 2 %-igem Methylaminwolframat negativ kontrastiert. Balken: 200 nm.

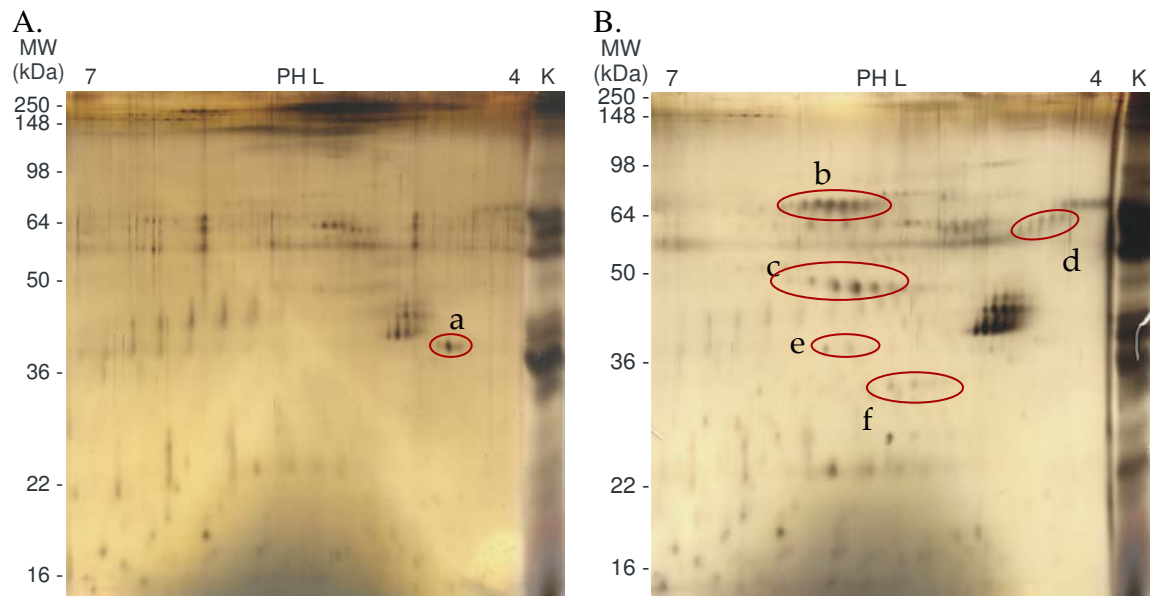


Abbildung 3.23. Silberfärbung der gereinigten Tollwutvirussuspensionen FL<sup>-</sup> (A) bzw. FL<sup>+</sup> (B) nach 2-D SDS-PAGE.

Mittels 2-D SDS-PAGE wurden die Proteine auf 13 cm langen Immobiline<sup>®</sup> DryStrips (Fa. Amersham Biosciences) mit einem linearen pH Gradienten von pH 4-7 isoelektrisch fokussiert (erste Dimension) und nach ihrem Molekulargewicht auf einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (zweite Dimension). a: weist auf Proteinspots, die nur in der sichtbaren Virusbande FL<sup>-</sup> vorhanden waren; b, c, d, e und f: zeigen Proteinspotsets, die nur in der sichtbaren Virusbande FL<sup>+</sup> vorhanden waren. K: Kontrolle. MW: Proteinmarker in Kilodalton (kDa).

Da die untersuchten Viruskonzentrate und die entsprechenden Vakzinen einen bedeutenden Anteil an Haptoglobin enthielten (Abbildung 3.19 B), wurden Analysen der Virusproben FL<sup>-</sup> bzw. FL<sup>+</sup> unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums gegen humanes Haptoglobin im Immunoblot durchgeführt. Weder in der Virusprobe FL<sup>-</sup> noch in FL<sup>+</sup> konnten Banden bzw. Proteinspots detektiert werden (nicht gezeigt). Ein höherer Reinigungsgrad der Virussuspensionen könnte diese Ergebnisse erklären.

## 4. DISKUSSION

Tollwut ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die nach Schätzung der WHO jährlich über 55000 Todesfälle beim Menschen verursacht (WHO, 2004). Sobald klinische Symptome auftreten, ist die Prognose schlecht und es kommt fast immer zum Tod. Der Ausbruch der Erkrankung lässt sich jedoch durch rechtzeitige Impfung verhindern. Ein wichtiger Bestandteil zur effektiven Vorbeugung der Tollwut beim Menschen ist die Anwendung wirksamer Impfstoffe.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zwei für die Tollwutprophylaxe beim Menschen zugelassene Impfstoffe mit den Bezeichnungen „Rabipur“ und „Rabivac“ (letzterer seit dem Jahr 2006 nicht mehr erhältlich) auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Multiple Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiche mit bekannten Sequenzen erlaubten eine phylogenetische Einordnung der in den beiden Impfstoffen enthaltenen Virusstämme FluryLEP bzw. PM 1503. Die biochemische Charakterisierung lieferte zudem wichtige Informationen über die Zusammensetzung der Impfstoffe.

### **4.1 Molekulare Charakterisierung der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503**

Die derzeit verfügbaren Tollwutimpfstoffe basieren auf Virusstämmen, die zur Spezies Rabies Virus gehören. Diese Stämme wurden meist von klassischen Tollwutisolaten aus an Tollwut erkrankten Menschen (Stämme FluryLEP/HEP) oder aus Tieren (z.B. Stämme PM, SAD, CVS, ERA, PV) abgeleitet (Tordo, 1996). Der Stamm FluryHEP resultierte aus multiplen Passagen des Stammes FluryLEP in embryonierten Hühnereiern. Die Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 werden für die Produktion der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vakzinen „Rabipur“ und „Rabivac“ verwendet. Die kompletten Nukleotidsequenzen beider Stämme wurden von Dr. Iris Stallkamp zur Verfügung gestellt und im Vergleich mit anderen Impfstämmen analysiert.

Sequenzanalysen auf Basis des gesamten Genoms zeigten die nahe Verwandtschaft zwischen FluryLEP und FluryHEP mit einer Identität von ungefähr 99 % auf Nukleotidebene. Dieses Ergebnis bestätigt den gemeinsamen Ursprung beider Stämme. Geringere Homologien wurden beim Vergleich von FluryLEP und PM 1503 gefunden (ungefähr 96 %).

Die für die Induktion einer protektiven Immunantwort wichtigsten viralen Proteine sind das Nukleoprotein und das Glykoprotein. Eine Aktivierung der T-Zell vermittelten Immunantwort wird durch beide Proteine ausgelöst: das Nukleoprotein stimuliert die Bildung Tollwutvirus-spezifischer T-Helferzellen, während das Glykoprotein T-Helfer- sowie T-Killerzellen aktiviert (Celis, et al., 1988; Ertl, et al., 1989; Macfarlan, et al., 1986; Macfarlan, et al., 1984; Wiktor, et al., 1984). Neben der T-Zell vermittelten Immunantwort spielt die humorale Immunantwort in Form von Virus-neutralisierenden Antikörpern eine wesentliche Rolle. Das Zielprotein für neutralisierende Antikörper ist das Hüll-Glykoprotein des Tollwutvirus.

Das Nukleoprotein induziert ebenfalls die Synthese von Antikörpern, welche einen gewissen Schutz gegen eine periphere Virusinokulation in Tieren ohne nachweisbaren Titer an neutralisierenden Antikörpern bewirken können (Fekadu, et al., 1992; Fu, et al., 1991; Lodmell, et al., 1993). Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Nukleoproteins der Stämme FluryLEP bzw. PM 1503 zeigte eine hohe Homologie zu anderen in Impfstoffen eingesetzten Virusstämmen. In den Proteinregionen, welche bekannte lineare Antigenepitope enthalten, wurden keine Aminosäureaustausche zwischen FluryLEP, FluryHEP, PM 1503, PV und SAD-B19 gefunden (Abbildung 3.2). Diese Regionen umfassen die Aminosäuren 358-367 („Antigenic site I“) sowie die Aminosäuren 359-366 und 375-383 („Antigenic site IV“) (Goto, et al., 2000; Minamoto, et al., 1994). Die Aminosäuren 21-35 und 404-418 bilden immundominante Epitope, die in Mäusen eine T-Helfer Antwort induzieren (Ertl, et al., 1989). Diese Peptidsequenzen sind zwischen den analysierten Impfstämmen mit Ausnahme eines Aminosäureaustausches an Position 26 bei CVS bzw. eines Austausches an

Position 410 bei PV konserviert. Es ist nicht bekannt, ob diese Austausche einen Einfluss auf die Funktion der T-Zell-Epitope haben.

Im Hinblick auf die Antigenität des Glykoproteins sind eine Vielzahl von T-Zell- (Macfarlan, et al., 1986; Macfarlan, et al., 1984) und B-Zell-Determinanten (Benmansour, et al., 1991; Marissen, et al., 2005) in der extrazellulären Domäne des Proteins identifiziert worden. Beschriebene konformationelle bzw. lineare Epitope schließen die Antigenregionen „Antigenic site“ I bis IV, minor site a, G1 und Epitop CR-57 ein (Benmansour, et al., 1991; Dietzschold, et al., 1988; Lafon, et al., 1984; Lafon, et al., 1983; Marissen, et al., 2005; Prehaud, et al., 1988). Die Mehrzahl der neutralisierenden monoklonalen Antikörper erkennt die „Antigenic sites“ II und III (Benmansour, et al., 1991). Beim Vergleich der analysierten Impfstämme in den entsprechenden Antigenregionen wurden mehrere Aminosäureaustausche gefunden (Abbildung 3.3). Austausche traten u.a. an den Positionen 40 und 184 des Glykoproteins auf. Diese Mutationen beeinflussen die „Antigenic site II“ und können zur Resistenz gegenüber Neutralisation durch site II spezifische Antikörper führen (Prehaud, et al., 1988). Eine weitere wichtige Position innerhalb der Glykoproteinsequenz ist die Aminosäure an Position 333 (Antigenregion „Antigenic site III“). Der Ersatz von Arg-333 durch eine andere Aminosäure (z.B. Gln, Gly oder Ile) kann zum Verlust der Reaktivität gegenüber einigen site III spezifischen neutralisierenden Antikörpern und zusätzlich zur Verminderung oder zum Verlust der Neurovirulenz führen (Coulon, et al., 1998; Dietzschold, et al., 1983b; Seif, et al., 1985; Tuffereau, et al., 1989). Die Virusstämme FluryLEP und PM 1503 enthalten beide ein Arginin an dieser Position. Im Stamm FluryHEP wurde die Aminosäure während der Passagierung in Hühnereiern gegen Glutamin ausgetauscht, was zur Attenuierung führte. Takayama-Ito et al. zeigten, dass FluryHEP durch Reversion von Gln zu Arg an dieser Position die Virulenz wiedererlangen kann (Takayama-Ito, et al., 2006). Neben den Aminosäureaustauschen an wichtigen Antigenpositionen wurden beim Vergleich der Glykoproteinsequenzen der Stämme FluryLEP, FluryHEP, PM 1503, CVS, PV und SAD-B19 Variationen in Anzahl und Lokalisation potenzieller N-Glykosylierungsstellen beobachtet (Abbildung 3.3). Eini-

ge dieser Veränderungen können benachbarte Antigenregionen chemisch beeinflussen oder zu einer Modifikation in ihrer Struktur führen.

Der Einfluss der gefundenen Sequenzunterschiede auf die Eigenschaften des Glykoproteins ist nicht bekannt. Veränderungen in den Antigenregionen können Wechselwirkungen mit dem Immunsystem beeinflussen (Klasse und Santantau, 2002). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass sich Tollwutvirusstämme in Bezug auf ihre immunologische Kreuzreaktivität einschließlich Kreuzneutralisation heterogen verhalten (Celis, et al., 1988; Macfarlan, et al., 1984). Das gilt besonders im Hinblick auf die Empfindlichkeit gegenüber neutralisierenden Antikörpern (Dietzschold, et al., 1990; Irie und Kawai, 2002; Irie, et al., 2002; Marissen, et al., 2005; Prosniak, et al., 2003a). Ein Einfluss der in Testverfahren verwendeten Virusstämme auf die gemessene Potenz von Tollwutimpfstoffen sowie auf die Höhe der gemessenen Titer an neutralisierenden Antikörpern nach Impfung kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Höhere Messwerte im NIH-Test sowie im Neutralisationstest wurden erreicht, wenn der Impfstamm homolog zu dem im Test verwendeten Tollwutvirusstamm war (Blancou, et al., 1989; Ferguson, et al., 1987; Moore, et al., 2005). Kreuzreaktionen von impfinduzierten neutralisierenden Antikörpern bestehen zwischen unterschiedlichen Viren der Spezies Rabies Virus sowie Vertretern anderer Lyssavirus Spezies, nämlich Duvenhage, European Bat Lyssavirus Type 1, European Bat Lyssavirus Type 2 und Australian Bat Lyssavirus (Lodmell, et al., 1995; Tordo, et al., 2005; WHO, 2004). Es wird angenommen, dass Ähnlichkeiten in den Antigenregionen des Glykoproteins der Impfstämme ausreichen, um eine Immunantwort auszulösen, die nach Exposition mit den genannten Lyssaviren gegen Erkrankung schützen kann. Dies gilt jedoch nicht für Viren, die zu den Spezies Mokola Virus oder Lagos Bat Virus gehören, was experimentell nach Immunisierung von Tieren gezeigt wurde (Fekadu, et al., 1988; Lafon, et al., 1988). Bei der Entwicklung neuer Tollwutimpfstoffe sollte ein breiteres Spektrum des Schutzes erreicht werden.

## **4.2 Biochemische Charakterisierung der Tollwutimpfstoffe „Rabipur“ und „Rabivac“**

Im Rahmen der weiteren Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit analysierten Vakzinen wurden verschiedene Aspekte berücksichtigt: (i) Die Integrität von Tollwutviruspartikeln in Virussuspensionen als Basis für die Potenz von Vakzinepräparationen wurde direkt mittels Elektronenmikroskopie sowie indirekt mit Hilfe neu etablierter ELISA-Verfahren untersucht, (ii) Proteine in den Viruskonzentraten bzw. den Vakzinen wurden mittels verschiedener biochemischer Verfahren umfassend charakterisiert.

### **4.2.1 Integrität von Tollwutviruspartikeln**

Die Wirksamkeit von Impfstoffen wird durch viele Faktoren wie die Natur der Antigene, die Antigendosis, den Administrationsweg, die Antigenpräsentation gegenüber dem Immunsystem und das Immunsystem selbst beeinflusst. In einigen Studien, beispielsweise für Impfstoffe gegen Influenza, wurde gezeigt, dass Vakzinen, die vollständige Virionen bzw. Virus-ähnliche Strukturen (viro-somale Impfstoffe) enthalten, im Vergleich zu Subunitvakzinen allgemein eine höhere Immunogenität besitzen (Huckriede, et al., 2005; Stephenson, et al., 2003). Auch im Fall der Tollwutimpfstoffe bestehen im Hinblick auf den erzielten Schutz Unterschiede zwischen Vakzinen auf der Basis entweder von Virus-Untereinheiten oder gesamten Virionen (Dietzschold, et al., 1983a; Fu, et al., 1991; Gupta, et al., 2005; Perrin, et al., 1985; Piza, et al., 2002; Prehaud, et al., 1989). Unter Berücksichtigung dieser Aspekte war die Überprüfung der Integrität von Viruspartikeln in den Tollwutviruskonzentraten bzw. in den Vakzinen (direkt durch Elektronenmikroskopie sowie indirekt durch die Quantifizierung des viralen Nukleo- und Glykoproteins unter verschiedenen Bedingungen im ELISA) ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit.



#### **4.2.1a Direkte Untersuchung der Integrität von Tollwutviruspartikeln**

Mittels Negativkontrastierung konnte die charakteristische Morphologie der intakten Virionen sowie das Vorhandensein von beschädigten Partikeln beobachtet werden. Mittels Immunogoldmarkierung ließ sich, wie erwartet, das Glykoprotein an der Oberfläche (Virushülle) der Viruspartikel nachweisen. Im Gegensatz dazu wurde das Nukleoprotein nur in teilweise oder vollständig zerstörten Virionen detektiert (Abbildung 3.12). Das Nukleoprotein bildet zusammen mit der RNS sowie dem Phospho- und Largeprotein das Ribonukleoprotein, welches durch die Virushülle umgeben wird; daher ist das Nukleoprotein bei intakten Viruspartikeln für Antikörper nicht zugänglich. Die Desintegration von Viruspartikeln ist möglicherweise ein Resultat des Impfstoffherstellungsprozesses und kann einen negativen Einfluss auf die Potenz von Impfstoffen haben (s.u.).

#### **4.2.1b Indirekte Untersuchung der Integrität von Tollwutviruspartikeln**

Ein Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung von ELISA-Systemen zur Quantifizierung von Tollwutvirusglykoprotein sowie Tollwutvirusnukleoprotein in Viruskonzentraten und Vakzinen. Dabei wurde vor allem die Entwicklung eines in-vitro-Tests als Ersatz des NIH („National Institutes of Health“) - Tests zur Messung der Potenz von Impfstoffen gegen Tollwut angestrebt. Im NIH-Test werden Gruppen von Mäusen mit unterschiedlichen Verdünnungen eines Referenz- sowie des Test-Impfstoffs intraperitoneal immunisiert. Nach einem definierten Zeitabschnitt folgt eine intrazerebrale Belastungsinfektion mit Tollwutvirus. Der NIH-Test ist aufwändig, zeitraubend und besitzt zudem eine hohe Variabilität. Außerdem werden jährlich mehrere tausend Versuchstiere, welche nach Tollwutvirusinfektion erkranken, durch Hersteller und Kontrollbehörden zur Durchführung des Tests eingesetzt. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung eines in-vitro Verfahrens zum Ersatz des NIH-Tests wünschenswert. ELISA-Systeme zur Quantifizierung des viralen Glykop-

roteins als in-vitro-Tests zur Potenzuntersuchung von Impfstoffen wurden bereits beschrieben (Gamoh, et al., 2003; Nagarajan, et al., 2006; Perrin, et al., 1990; Rooijackers, et al., 1996). Bislang hat jedoch keines dieser Systeme zum Ersatz des NIH-Tests weltweit Anerkennung gefunden. Der Grund dafür liegt insbesondere in der fehlenden Korrelation zwischen den Ergebnissen der Ersatzverfahren und denen des NIH-Tests.

Auf der Suche nach möglichen Wegen zu einer besseren Korrelation zwischen den Ergebnissen von in-vitro-Tests und in-vivo-Tests im Hinblick auf die Potenz von Impfstoffen ist es wichtig, Faktoren zu berücksichtigen, die einen Einfluss auf die Induktion einer schützenden Immunantwort haben. Um eine wirkungsvolle Immunantwort auszulösen, sollten virale Antigene dem Immunsystem in möglichst nativer Form präsentiert werden. So haben Piza et al. (Piza, et al., 2002) gezeigt, dass der Anteil unterschiedlicher Konformationen des Tollwutvirusglykoproteins (freies lösliches Glykoprotein, Virus-gebundenes Glykoprotein) die Potenz einer Vakzinepräparation beeinflusst. Demnach könnte die Menge des in intakten Viruspartikeln vorhandenen Glykoproteins mit der Impfstoffpotenz korrelieren. Auf der Basis dieser Hypothese wurden Sandwich-ELISA-Tests für die Quantifizierung des Tollwutvirusglykoproteins (G-ELISA) sowie des Tollwutvirusnukleoproteins (N-ELISA) in den Viruskonzentrationen bzw. in den Vakzinen unter nativen und denaturierenden Bedingungen etabliert. Durch Vergleich der relativen Menge der beiden Proteine bzw. der Menge an nachzuweisendem Nukleoprotein vor und nach Behandlung von Virionen sollte eine relative Quantifizierung intakter Partikel in den Impfstoffpräparationen möglich sein. Wie bereits beschrieben, ist das Nukleoprotein im Inneren von Virionen lokalisiert und somit bei intakten Partikeln für Antikörper nicht zugänglich. Durch die Behandlung der Proben mit Detergenzien wird die Freisetzung des Proteins aus Virionen erreicht.

Zur Etablierung der ELISA-Systeme wurden die gegen das Nukleo- bzw. gegen das Glykoprotein gewonnenen Seren nach Reinigung und Biotinylierung der Antikörper verwendet. Als Standard dienten die zur Immunisierung eingesetz-

ten Antigene. Da es sich bei den Standards um gereinigte Proteine aus infizierten Insektenzellen handelte, wurden Extrakte aus MOCK-infizierten Insektenzellen als negative Kontrollen eingesetzt. Anhand der Proteinkonzentrationen der Standards war es möglich, die entsprechenden Proteine in den Viruskonzentraten und in den Vakzinen zu quantifizieren.

Nach Ermittlung der optimalen Konzentrationen der einzelnen Reagenzien wurden diverse Qualitätsparameter der ELISAs geprüft. Die analytische Sensitivität für das rekombinante Nukleoprotein lag bei ca. 180 ng/ml und für das rekombinante Glykoprotein bei 30 ng/ml. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit beider ELISAs wurde Intra- und Inter-Assay-Variation überprüft. Aus den Untersuchungen ergab sich für den N-ELISA ein durchschnittlicher Variationskoeffizient für die Intra- bzw. die Inter-Assay-Variation von 10,40 % bzw. 12,16 %. Im Fall des G-ELISAs lagen diese bei 14,94 % bzw. 25,44 %. Gemäß OIE (Office International des Epizooties) zeigt ein Variationskoeffizient unter 20 % ausreichende Wiederholbarkeit eines diagnostischen Tests an. Darüber hinaus werden Variationskoeffizienten bis 30 % toleriert (OIE, 2004).

Die Quantifizierung der Nukleo- und Glykoproteine in Viruskonzentraten und Vakzinen wurde unter nativen Bedingungen (ohne Behandlung oder nach Behandlung mit einem milden Detergenz) sowie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das Nukleoprotein konnte in allen Testproben nachgewiesen werden. Die gemessene Proteinmenge in den behandelten Proben war im Vergleich mit den nicht behandelten Proben deutlich höher. Da das Nukleoprotein im Inneren der Virionen lokalisiert ist, lässt der Nachweis des Proteins in den nicht behandelten Proben auf das Vorhandensein von defekten Viruspartikeln schließen. Dies wurde mittels Immunelektronenmikroskopie bestätigt (Kapitel 3.4.2). Aus dem Vergleich der Menge des Nukleoprotein vor und nach Behandlung der Proben lässt sich außerdem ableiten, dass ca. ein Zehntel des gesamten Nukleoproteins in den Impfstoffpräparationen entweder in freier Form vorlag oder in defekten Partikeln zugänglich war. Hieraus folgt, dass in den untersuchten Impfstoffpräparationen ungefähr 90 % dieses viralen

Antigens in intakten Partikeln vorlag. Im Hinblick auf die Erhaltung von Viruspartikeln zeigten die Ergebnisse, die mit verschiedenen Vakzinebatches erhalten wurden, eine hohe Konstanz des Produktionsprozesses. Um dieses Resultat zu erhärten, sollten weitere Proben im ELISA untersucht werden. Ein zentraler Punkt des Impfstoff-Produktionsprozesses ist die konsequente Herstellung von Impfstoffbatches mit ähnlichen Eigenschaften der Batches, die Gewährleistung der Chargenkonsistenz im Hinblick auf Sicherheit und Wirksamkeit zeigen (Hendriksen, et al., 2008; Hendriksen, 2006).

Mit dem G-ELISA ließ sich das Glykoprotein in unbehandelten Proben nur sehr schwach nachweisen. Die Reaktionsintensität wurde erheblich stärker, wenn die Proben nach denaturierender Behandlung eingesetzt wurden. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis sind Eigenschaften der Testantikörper. Die Nukleo- und Glykoproteine der beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tollwutvirusstämme wurden im Baculovirussystem exprimiert. Insektenzellen dienten als Wirtssystem, da in diesen eukaryotischen Zellen Proteine mit weitgehend authentischen posttranslationalen Modifikationen exprimiert werden können und sich große Mengen rekombinanter Proteine gewinnen lassen (O'Relly, et al., 1994). Mehrere Studien haben gezeigt, dass diese rekombinanten Proteine im direkten Vergleich mit authentischen Virusproteinen ähnliche antigenetische und immunogene Eigenschaften besitzen (Drings, et al., 1999; Prehaud, et al., 1990; Prehaud, et al., 1989; Tuffereau, et al., 1998). Nach erfolgreicher Expression des Glykoproteins traten Probleme hinsichtlich Löslichkeit und nachfolgend bei der Reinigung des rekombinanten Proteins auf. Daher wurde das Glykoprotein ohne zytoplasmatische und ohne Transmembran-Region exprimiert, um eine effiziente Freisetzung des Proteins in den Kulturüberstand zu erreichen. Aus nicht bekannten Gründen ließ sich jedoch nur eine geringe Menge des sezernierten Proteins aus dem Überstand infizierter Insektenzellen reinigen. Um die beschriebenen Schwierigkeiten bei der Reinigung des rekombinanten Glykoproteins in nativer Form zu umgehen, wurde die Elektroelution nach SDS-PAGE als weiteres Reinigungsverfahren gewählt. Es bestand die Hoffnung, dass sich auf diese Weise zumindest neutralisierende

Antikörper gegen lineare Epitope des Proteins, wie z.B. „CR-57“, gewinnen lassen (Bakker, et al., 2005; Luo, et al., 1997; Mansfield, et al., 2004; Marissen, et al., 2005). Da sich das Glykoprotein nur unter denaturierenden Bedingungen befriedigend reinigen ließ, weist es eine im Vergleich mit der nativen Form veränderte Konformation auf. Die nach Immunisierung mit diesem Antigen gewonnenen Antikörper erkennen daher z.T. Epitope, die in nativer Form des Proteins nicht zugänglich sind.

Wie bereits erwähnt, ist das Glykoprotein des Tollwutvirus das Zielprotein für neutralisierende Antikörper. Ein wichtiger Mechanismus der Virusneutralisation von Tollwutvirus ist die Blockierung der Virus-Wirtszell-Interaktion durch Abdeckung der Rezeptor-Bindungsstelle auf dem Oberflächenprotein von Virionen. Andererseits kann die Reaktion zwischen einem Antikörper und dem Glykoprotein konformationelle Veränderungen des Proteins induzieren, was zur Hemmung der Rezeptor-Bindungsfähigkeit des Virions führen kann (Irie und Kawai, 2002; , 2005; Raux, et al., 1995). Um zu untersuchen, ob die gegen das Glykoprotein gewonnenen Seren das Tollwutvirus neutralisieren, wurden die Seren im FAVN-Test („Fluorescent Antibody Virus Neutralisation“ Test) eingesetzt. Hier ließen sich nur sehr geringe Titer an neutralisierenden Antikörpern nachweisen.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ließen sich die gewonnenen Seren gegen das Glykoprotein von Tollwutvirus nicht im ELISA zur Quantifizierung des Virus-gebundenen Glykoproteins verwenden. Wie bereits dargelegt, ist die Immunogenität des Tollwutvirusglykoproteins in erheblichem Maß von seiner Konformation abhängig. Daher sollten Antigene zur Gewinnung polyklonaler Seren so präpariert werden, dass die authentischen Epitope weitgehend erhalten bleiben. Heterolog exprimierte Proteine entsprechen u.U. nicht der nativen Form. Im Fall des Baculovirus-Expressions-Systems können rekombinante Proteine mit weitgehend authentischen posttranslationalen Modifikationen, einschließlich Ausbildung von Disulfidbrücken, Glykosylierung und Oligomerisierung, exprimiert werden. Es gibt allerdings posttranslationale Prozesse wie z.B.

die Glykosylierung, die sich zwischen Insektenzellen und Säugerzellen unterscheiden (Jarvis, 2003). Eine Alternative zur rekombinanten Expression stellt die Reinigung des Tollwutvirusglykoproteins aus Viruspartikeln unter nativen Bedingungen dar (Dietzschold, 1996). Versuche, das authentisch virale Protein zu reinigen, wurden auch unter Verwendung von Viruskonzentraten durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei gelang die Trennung des Glykoproteins vom viralen Nukleokapsid. Allerdings zeigten weitere Untersuchungen das Vorhandensein zusätzlicher, nicht viraler Proteine.

Eine Untersuchung der Proteine in Viruskonzentraten ergab, dass es sich bei der Mehrzahl der nicht viralen Proteine um Serumproteine aus dem Produktionsprozess handelte. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Verwendung von FBS im Zellkulturmedium auf die relative Menge viraler Proteine untersucht. Im Gegensatz zu den Viruskonzentraten aus der Vakzineherstellung enthielten die ohne FBS hergestellten und gereinigten Tollwutviruspräparationen kein nachweisbares Haptoglobin, eine der Hauptverunreinigungen in Impfstoffen gegen Tollwut. Daher könnte die Verwendung serumfrei hergestellter Tollwutvirussuspensionen die Reinigung des nativen Glykoproteins und somit die Etablierung des gewünschten G-ELISA ermöglichen.

Es ist geplant, verschiedene Viruskonzentrate und Vakzinepräparationen mit bekannten Resultaten im NIH-Test unter Verwendung des etablierten N-ELISAs bzw. eines neu zu etablierenden G-ELISAs zu untersuchen. Diese Versuche werden zeigen, ob die ELISA-Ergebnisse Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von Tollwutvirusimpfstoffen erlauben.

#### **4.2.2 Charakterisierung der Proteome von Vakzinen**

Ein weiteres Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Proteome zweier Vakzinen. Vakzinen entstehen aus dem Viruskonzentrat durch Verdünnung und Zusatz von modifizierter Gelatine (Polygelin) als Stabilisator. Aufgrund des geringeren Proteingehalts in den Vakzinen im Vergleich mit den entsprechenden Viruskonzentraten wurden hauptsächlich Viruskon-

zentratproben zur Proteinidentifizierung verwendet. Zur Analyse der Proteome beider Impfstoffe wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese als Methode zur Trennung der Proteine ausgewählt. Dieses Verfahren ermöglicht durch sein großes Auflösungsvermögen die Identifikation geringfügiger Unterschiede in der Struktur und Ladung einzelner Proteinmoleküle (z.B. durch posttranslationale Modifikationen). Die fünf viruskodierten Proteine (N, P, M, G und L) und sechs (Vakzine „Rabipur“) bzw. zwei (Vakzine „Rabivac“) nicht virale Proteine konnten als Bestandteile der Impfstoffe identifiziert werden (Tabelle 3.7).

#### 4.2.2a Identifizierung viraler Proteine

Um die Tollwutvirusproteine nachzuweisen, wurden zahlreiche Antikörper aus unterschiedlichen Quellen verwendet. Für den Nachweis von Nukleo- und Glykoprotein wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten polyklonalen Seren eingesetzt.

Nach Trennung der Proteine durch 2-D SDS-PAGE wurden bei Immunoblot-Analysen zahlreiche Isoformen der Virusproteine mit variablen isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten identifiziert. Das Nukleoprotein wanderte mit einer molekularen Masse von ungefähr 57 kDa und zeigte mehrere isoelektrische Formen (Abbildung 3.14). Diese Isoformen-Variabilität beruht wahrscheinlich auf posttranslationalen Modifikationen, z.B. Phosphorylierung.

Im Fall des Glykoproteins wurden zusätzlich zur monomeren Form des Proteins einige Spots mit höheren Molekulargewichten und geringgradig unterschiedlichen pI-Werten identifiziert (Abbildung 3.15). Eine Variabilität in Molekulargewicht und den pI-Werten der Isoformen von Glykoproteinen in 2-D SDS-PAGE ist häufig Folge unterschiedlicher Glykosylierungsmuster (Packer, et al., 1998). Proteinspots mit erheblich unterschiedlichen Molekulargewichten deuten auf das Vorhandensein von Proteinkomplexen hin. Um mögliche Proteininteraktionen durch Disulfidbrücken zu untersuchen, wurden zusätzlich Immunoblot-Analysen nach Trennung der Proteine durch 1-D SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Eine

Hauptbande von ca. 67 kDa, welche dem erwarteten Molekulargewicht des monomeren glykosylierten G-Proteins entspricht, sowie zusätzliche schwache Banden mit höheren molekularen Massen wurden beobachtet. Die Authentizität der Banden wurde unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen das Tollwutvirusglykoprotein nachgewiesen. Diese Versuche bestätigten das Vorhandensein von G-Proteinmolekülen in den Proteinspots mit höheren Molekulargewichten. Im Hinblick auf die 2D- SDS-PAGE ist bekannt, dass während der Probenpräparation Protein-Protein Interaktionen und daraus folgend Aggregatbildungen vorkommen können, die zu einer Vielzahl „unechter“ Proteinspots führen können (Hamdan, et al., 2001; Herbert, et al., 2001; Hoving, et al., 2002; Shaw und Riederer, 2003). Interaktionen zwischen dem viralen Glykoprotein und anderen Proteinen können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (s.u.). Diese Interaktionen könnten Auswirkungen auf die Antigenität des Glykoproteins, beispielsweise durch Abdeckung wichtiger Antigenregionen, haben. Inwieweit solche Protein-Interaktionen die Potenz von Tollwutvirus-Impfstoffen beeinflussen, bleibt allerdings offen.

#### **4.2.2b Identifizierung nicht viraler Proteine**

Zusätzlich zu den viralen Proteinen wurden nicht virale Proteine in den Vakzinpräparationen nachgewiesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass zelluläre Proteine wie Actin und „Heat Shock“-Proteine des „hsp70“-Typs mit Tollwutviruspartikeln und Virionen anderer negativ-strängiger RNS-Viren interagieren können (Naito und Matsumoto, 1978; Sagara und Kawai, 1992; Sagara, et al., 1995). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Actin sowie andere Proteine des Zytoskeletts vermutlich an der Replikation behüllter Viren beteiligt sind; dies könnte den Transport von Proteinen zur Zellmembran, Assembly sowie Ausknospen von Viruspartikeln einschließen (Han und Harty, 2005; Nermut, et al., 1999; Ott, et al., 1996). Daher war der Nachweis von zellulärem Actin in der Viruskonzentratprobe nicht überraschend.

Ein weiteres nicht virales Protein, das in den Vakzinen in erheblichem Umfang nachgewiesen wurde, war Haptoglobin. Natives Haptoglobin existiert in Form



Disulfid-verbundener Oligomerkomplexe, die aus je zwei  $\beta$ -Ketten ( $\sim M_r$  40 kDa) und entweder zwei identischen  $\alpha$ -1 Ketten ( $\sim M_r$  9 kDa), zwei  $\alpha$ -2 Ketten ( $\sim M_r$  16,5 kDa) oder je einer  $\alpha$ -1 Kette und  $\alpha$ -2 Kette bestehen (Ahmed, et al., 2004; Muranjan, et al., 1998; Tseng, et al., 2004). Die unterschiedlichen Untereinheiten sowie Isoformen, die variable Grade posttranslationaler Modifikationen repräsentieren, wurden in Immunoblot-Analysen nach Trennung der Proteine in der 2-D SDS-PAGE nachgewiesen (Abbildung 3.19 B). In einigen Proteinspots mit höheren Molekulargewichten wurden durch MALDI-TOF MS ebenfalls Haptoglobin-Sequenzen identifiziert (Abbildung 3.20, Tabelle 3.6). Weiterhin erkannte ein anti-Haptoglobin Antikörper Proteinspots von ca. 78 und 130 kDa mit pI-Werten zwischen 4,7-5,8 (Abbildung 3.19 B). In den Viruskonzentraten wurden Proteinspots mit einer ähnlichen elektrophoretischen Mobilität, aber etwas höheren pI-Werten, unter Verwendung des Serums gegen das Tollwutvirus-Glykoprotein nachgewiesen (Abbildung 3.15). Diese Beobachtungen legen nahe, dass Haptoglobin mit anderen Proteinen, die möglicherweise viralen Ursprungs sind, Komplexe bildet. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten zusätzliche Experimente wie Co-Immunpräzipitation unter Verwendung von antiviralen Antikörpern und Antikörpern gegen Haptoglobin durchgeführt werden.

Die große Menge des Albumins in den Viruskonzentraten und Vakzinen lässt sich durch das Vorhandensein dieses Proteins im Kulturmedium für die Virusvermehrung erklären (Barth und Franke, 1996; Branche, 1996). Haptoglobin, Hemopexin und andere Plasmaproteine kommen häufig als Verunreinigungen kommerzieller humaner Albumin-Lösungen vor (Matejtschuk, et al., 2000; Wicher und Fries, 2004). Aus diesem Grund ist eine Analyse der für die Vakzineherstellung verwendeten humanen Albumin-Lösung sinnvoll. Hieraus können sich Rückschlüsse auf den Ursprung dieser Proteine ergeben.

Analysen der Proteome der Impfstoffe gaben wertvolle Informationen hinsichtlich der vorhandenen Proteine, der Identität der nicht viralen Proteine und ihres relativen Anteils im Vergleich mit den viralen Proteinen. Die Hauptverunreinigungen in den untersuchten Impfstoffen sind Albumin und Haptoglobin.

Tollwutimpfstoffe aus gereinigten Zellkulturüberständen oder Hühnerembryonen werden im Allgemeinen gut toleriert. Unerwünschte lokale und systemische Reaktionen sind jedoch berichtet worden (Arora, et al., 2004; Dreesen, et al., 1989). Symptome ähnlich der Serumkrankheit oder Urtikaria traten sporadisch nach Booster-Immunisierung mit Zellkulturimpfstoffen, die mittels humaner diploider Zellen gewonnen wurden, auf (Warrington, et al., 1987; WHO, 2004). Für Überempfindlichkeitsreaktionen nach Booster-Immunisierungen mit diesen Vakzinen wurde das als Folge der  $\beta$ -Propiolacton-Behandlung allergieauslösende humane Serumalbumin verantwortlich gemacht (Anderson, et al., 1987; Swanson, et al., 1987). In diesem Zusammenhang erscheint es interessant zu untersuchen, inwieweit bei geimpften Personen Immunreaktionen gegen die kontaminierenden Serumproteine nachgewiesen werden können. Hieraus lassen sich Hinweise auf Notwendigkeit der Vermeidung von Kontaminationen in den Vakzinen mit dem Ziel einer besseren Verträglichkeit der Tollwutvirus-Impfstoffe gewinnen.

Im Hinblick auf den fast immer tödlichen Ausgang einer Tollwuterkrankung ist der Einsatz von Impfstoffen für präexpositionelle Immunisierung u.a. bei Personal in Laboratorien mit Tollwutinfektionsrisiko, bei Tierärzten und Personen mit Kontakt zu Fledermäusen oder als postexpositionelle Prophylaxe bei Verdacht oder erwiesener Exposition gegenüber Tollwutvirus dringend geboten (Bhardwaj, et al., 2002; Briggs, 2001; Dreesen, et al., 1989; Nicholson, et al., 1987). Die Rate beobachteter Nebenwirkungen ist nach Tollwutimpfung ähnlich der für andere Impfstoffe (CDC, 2003). Unerwünschte Reaktionen stehen meist im Zusammenhang mit der Anzahl der Impfungen (CDC, 2003; WHO, 2001). Kommerzielle Impfstoffformulierungen enthalten häufig zusätzliche Substanzen wie Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Adjuvantien oder/und weitere Bestandteile, die während des Herstellungsprozesses zusätzlich zu den spezifischen Immunogenen verwendet worden sind (Georgitis und Fasano, 2001; Offit und Jew, 2003).

Die hier dargestellten Daten zeigen Möglichkeiten für die Erhöhung der Reinheit von Impfstoffen auf. Der Herstellungsprozess könnte beispielsweise durch zusätzliche Schritte ergänzt werden, die zur Eliminierung des Albumins und des Haptoglobins führen.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine umfassende Charakterisierung von zwei Tollwutimpfstoffen („Rabipur“ und „Rabivac“) zur Anwendung beim Menschen auf genetischem, morphologischem und biochemischem Niveau. Die Ergebnisse liefern neue Kenntnisse über die Produkte und bilden eine Grundlage zur Optimierung der Qualitätskontrolle. Außerdem lässt sich aus den Untersuchungen über die Integrität von Viruspartikeln in den Proben schließen, dass die Antigenkonformation wegen ihres Einflusses auf die Potenz in einer Impfstoffpräparation beurteilt werden sollte. Durch die Verwendung des etablierten N-ELISAs wurde erstmals eine Möglichkeit zur relativen Quantifizierung von intakten Tollwutviruspartikeln in Impfstoffpräparationen beschrieben. Diese kann als eine Grundlage für einen in-vitro-Test zum Ersatz des NIH-Tests zur Messung der Potenz von Impfstoffen gegen Tollwut dienen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Tollwut ist eine zoonotische Viruserkrankung, die in ungeimpften Wirten fast immer tödlich verläuft. Zurzeit zugelassene Impfstoffe zur Anwendung beim Menschen basieren überwiegend auf gereinigten inaktivierten Virionen, die über Zellkulturen gewonnen wurden. Diese Vakzinen gelten als sicher und wirksam, allerdings treten nach Immunisierung in einigen Fällen Nebenwirkungen auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei für die Tollwutprophylaxe des Menschen zugelassene Impfstoffe, "Rabipur" und "Rabivac", charakterisiert. Während die Vakzine "Rabipur" den Tollwutvirusstamm FluryLEP beinhaltet, basiert die Vakzine "Rabivac" auf dem Stamm PM 1503.

Analysen der genetischen Heterogenität der genannten Virusstämme im Vergleich mit anderen Impfstämmen zeigten Homologien auf Basis der Nukleinsäuren zwischen 90,23 % und 99,47 %. Die wichtigsten viralen Proteine, die Schutz von einer Erkrankung an Tollwut induzieren, sind das Nukleoprotein und das Glykoprotein. Die Analysen der entsprechenden abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten mit jeweils fast 100 % eine hohe Homologie des Nukleoproteins beider Stämme zu anderen Impfstämmen und damit eine Sequenzkonservierung der Antigenregionen. Im Gegensatz dazu wurden nach Vergleich der Glykoproteinsequenzen mehrere Aminosäureaustausche in Antigenregionen sowie Variationen in Anzahl und Lokalisierung potenzieller N-Glykosylierungsstellen gefunden. Diese Veränderungen können Unterschiede zwischen den Tollwutvirusstämmen im Hinblick auf ihre immunologische Kreuzreaktivität einschließlich Kreuzneutralisation erklären.

Zur biochemischen Charakterisierung wurden das Nukleo- und das Glykoprotein der Virusstämme FluryLEP und PM 1503 im Baculovirus-System exprimiert und nach Reinigung zur Gewinnung polyklonaler Seren verwendet. Nach Charakterisierung der Seren mittels Immunoblot, Immunfluoreszenz und Neutralisationstest wurden diese für die Etablierung von Sandwich ELISAs zur

Quantifizierung des Nukleoproteins (N-ELISA) und des Glykoproteins (G-ELISA) verwendet.

Die Integrität der Viruspartikel, eine entscheidende Determinante für die Potenz von Impfstoffpräparationen, wurde direkt in der Immunelektronenmikroskopie sowie indirekt mit Hilfe der etablierten ELISA-Verfahren untersucht. Das Nukleoprotein ist im Inneren von Virionen lokalisiert und somit bei intakten Partikeln für Antikörper nicht zugänglich. Durch Freisetzung des Nukleoproteins und weitere Analysen der Proben im ELISA konnte gezeigt werden, dass ungefähr 90 % dieses viralen Proteins nicht zugänglich für Antikörper war und somit wahrscheinlich als Teil von Viruspartikeln vorlag. Elektronenmikroskopisch ließen sich intakte und defekte Virionen nachweisen. Somit liefern diese Ergebnisse eine Erklärung für den Nachweis von Tollwutvirusnukleoprotein mittels des N-ELISAs in nativen Impfstoffpräparationen.

Weiterhin wurde die Proteome der Impfstoffpräparationen charakterisiert. Virale und nicht virale Proteine ließen sich mit Hilfe verschiedener Verfahren wie Immunoblot, N-terminale Peptid-Sequenzierung sowie MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation time-of-flight Mass Spectrometry) identifizieren. Die viralen Nukleo-, Glyko-, Matrix-, Phospho- und Largeproteine wurden in dem Impfstoff "Rabipur" und, mit Ausnahme des Phosphoproteins, auch in dem Impfstoff "Rabivac" nachgewiesen. Zusätzlich konnten sechs nicht virale Proteine als Bestandteile der Impfstoffe identifiziert werden. Die Serumproteine Albumin und Haptoglobin wurden als Hauptverunreinigungen in beiden Vakzinen gefunden. In dem Impfstoff "Rabipur" wurden zusätzlich Hemopexin, Actin, Alpha-1b-Glykoprotein und Afamin nachgewiesen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse beinhalten eine umfassende Charakterisierung von zwei Tollwutimpfstoffen auf morphologischem, molekularem und biochemischem Niveau. Hieraus lassen sich Möglichkeiten zur Optimierung der Qualitätskontrolle ableiten; die Analysen legen nahe, dass die Integrität von Viruspartikeln in Tollwut-Impfstoffpräparationen beurteilt werden sollte.

## 6. SUMMARY

Rabies is a viral zoonotic disease with almost invariably fatal outcome in unvaccinated hosts. Currently licensed vaccines for human use are generally based on purified inactivated virus grown in cell culture. These vaccines are regarded as safe and efficacious; however, after vaccination side effects occur in some cases.

In the present study two licensed vaccines for the prevention of human rabies, namely "Rabipur" and "Rabivac", were characterised. The vaccine "Rabipur" is based on rabies virus strain FluryLEP while the vaccine "Rabivac" contains virus strain PM 1503.

Analyses of genetic heterogeneity of these virus strains in comparison with other vaccine strains revealed homologies between 90,23 % and 99,47 % at the nucleotide level. The most important viral proteins involved in protection against rabies are the glycoprotein and the nucleoprotein. Amino acid sequence comparison of FluryLEP and PM 1503 nucleoprotein with other vaccine strains showed high homology with nearly 100 % sequence conservation within the known antigenic regions. In contrast, sequences of the glycoprotein showed some amino acid exchanges and variation in the number and position of potential N-glycosylation sites. Such differences may explain the variability in cross-reactivity and cross-neutralisation between virus strains.

In order to characterise the vaccines at the biochemical level, the nucleoprotein and the glycoprotein of FluryLEP and PM 1503 strains were expressed via the baculovirus system and used after purification to generate polyclonal sera. After characterization by immunoblot, immunofluorescence and virus neutralisation, polyclonal sera were used to establish sandwich ELISAs for the quantification of the viral nucleoprotein (N-ELISA) and the viral glycoprotein (G-ELISA). The integrity of viral particles, a crucial determinant for the potency of vaccine preparations, was directly examined by immunoelectron microscopy and indirectly by using the established ELISAs. The nucleoprotein is localized within

virions and therefore not accessible to antibodies in intact particles. After the release of the nucleoprotein and further analysis of the samples using ELISA, it could be demonstrated that approximately 90 % of this viral protein was not accessible to antibodies and thus probably part of virus particles. Negative staining revealed the presence of intact and damaged particles. Accordingly, these results provide an explanation of the detection of viral nucleoprotein in native vaccine preparations using the N-ELISA.

Furthermore, the proteome of the vaccine preparations was characterized. Viral and non viral proteins were identified using different methods such as immunoblot, N-terminal amino acid sequencing and MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry). The viral nucleoprotein, glycoprotein, phosphoprotein, matrix and large protein were identified in the vaccine "Rabipur" and, with the exception of the phosphoprotein, in the vaccine "Rabivac". In addition, six non viral proteins could be identified as components of the vaccines. The serum proteins albumin and haptoglobin were recognized as the major contaminants in the vaccine preparations. The vaccine "Rabipur" contained also hemopexin, actin, alpha-1b-glycoprotein and afamin.

The results of the presented study reveal detailed information about two rabies vaccines for humans at the morphological, molecular and biochemical level. The results imply ways for improvement of vaccine quality control; the analyses suggest that the integrity of viral particles in vaccine preparations against rabies should be assessed.

## 7. RESUMEN

La rabia es una enfermedad zoonótica viral, casi siempre con resultados mortales en huéspedes no vacunados. La mayoría de vacunas actuales y licenciadas para uso humano se basan en virus inactivado y purificado, que ha sido previamente propagado en cultivo celular. Estas vacunas se consideran seguras y eficaces, sin embargo, en algunos casos se producen efectos secundarios después de la vacunación.

En el presente estudio se caracterizaron las vacunas "Rabipur" y "Rabivac", licenciadas para la prevención de la rabia humana. La vacuna "Rabipur" contiene la cepa FluryLEP mientras que la vacuna "Rabivac" se basa en la cepa PM 1503 del virus de la rabia.

Los análisis de la heterogeneidad genética de estas cepas de virus en comparación con otras cepas vacunales revelaron homologías de la secuencia de ácidos nucleicos entre 90,23 % y 99,47 %. Las principales proteínas virales implicadas en la protección contra la rabia son la glicoproteína y la nucleoproteína. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la nucleoproteína de las cepas FluryLEP y PM 1503 con la de otras cepas vacunales mostró alta homología con casi el 100 % de conservación de la secuencia dentro de las regiones antigénicas conocidas. Por lo contrario, al comparar las secuencias de la glicoproteína se observaron algunos cambios de aminoácidos y variaciones en el número y localización de sitios potenciales de N-glicosilación. Estas diferencias pueden explicar la variabilidad en la reactividad y neutralización cruzada entre cepas virales.

Con el fin de caracterizar las vacunas a nivel bioquímico, la nucleoproteína y la glicoproteína de las cepas FluryLEP y PM 1503 se expresaron a través del sistema de Baculovirus y, después de su purificación, se utilizaron para la generación de sueros policlonales. Tras la caracterización en inmunoblot, inmunofluorescencia y neutralización viral, los sueros policlonales fueron



utilizados para establecer sandwich ELISA con el fin de cuantificar la nucleoproteína viral (N-ELISA) y la glicoproteína viral (G-ELISA).

La integridad de partículas virales, un factor determinante para la potencia de preparaciones vacunales, fue examinada directamente en microscopía inmunoeléctronica e indirectamente mediante el uso de las pruebas de ELISA establecidas. La nucleoproteína está localizada dentro de los viriones y, por tanto, no es accesible a los anticuerpos en las partículas intactas. Después de la liberación de la nucleoproteína y adicionales análisis de las muestras mediante ELISA, pudo ser demostrado que aproximadamente el 90 % de esta proteína viral no era accesible a los anticuerpos y, por tanto, probablemente formaba parte de las partículas virales. En microscopía electrónica con tinción negativa se reveló la presencia de partículas intactas y defectuosas. Por lo tanto, estos resultados proporcionan una explicación a la detección de nucleoproteína viral en preparaciones vacunales nativas utilizando la N-ELISA.

Adicionalmente, el proteoma de las preparaciones vacunales fue caracterizado. Proteínas virales y no virales fueron identificadas utilizando diferentes métodos, tales como inmunoblot, *N-terminal amino acid sequencing* y MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry*). Las proteínas virales, nucleoproteína, glicoproteína, phosphoproteína, matrix y large proteínas, fueron identificadas en la vacuna "Rabipur" y, con la excepción de la phosphoproteína, en la vacuna "Rabivac". Adicionalmente, seis proteínas no virales pudieron ser identificadas como componentes de las vacunas. Las proteínas albúmina sérica y haptoglobina fueron reconocidas como los principales contaminantes de las preparaciones vacunales. En la vacuna "Rabipur" fueron también identificadas las proteínas hemopexin, actina, alfa-1B-glicoproteína y afamina.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto información detallada acerca de dos vacunas contra la rabia a nivel morfológico, molecular y bioquímico. Estos contribuyen a optimizar el control de calidad de las vacunas. Los análisis sugieren que la integridad de las partículas virales en preparaciones vacunales contra la rabia debe ser evaluada.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Aebersold, R. und Mann, M. (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**: 198-207.
- Ahmed, N., Barker, G., Oliva, K. T., Hoffmann, P., Riley, C., Reeve, S., Smith, A. L., Kemp, B. E., Quinn, M. A. und Rice, G. E. (2004). "Proteomic-based identification of haptoglobin-I precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer." British Journal of Cancer **91**: 129-140.
- Ambrozaitis, A., Laiskonis, A., Balciuniene, L., Banzhoff, A. und Malerczyk, C. (2006). "Rabies post-exposure prophylaxis vaccination with purified chick embryo cell vaccine (PCECV) and purified Vero cell rabies vaccine (PVRV) in a four-site intradermal schedule (4-0-2-0-1-1): an immunogenic, cost-effective and practical regimen." Vaccine **24**(19): 4116-21.
- Anderson, M. C., Baer, H., Frazier, D. J. und Quinnan, G. V. (1987). "The role of specific IgE and beta-propiolactone in reactions resulting from booster doses of human diploid cell rabies vaccine." J. Allergy Clin. Immunol. **80**(6): 861-868.
- Arora, A., Moeller, L. und Froeschle, J. (2004). "Safety and immunogenicity of a new chromatographically purified rabies vaccine in comparison to the human diploid cell vaccine." J Travel Med **11**(4): 195-9.
- Badrane, H., Bahloul, C., Perrin, P. und Tordo, N. (2001). "Evidence of two Lys-savirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity." J Virol **75**(7): 3268-76.
- Baer, G. M., Shaddock, J. H., Quirion, R., Dam, T. V. und Lentz, T. L. (1990). "Rabies susceptibility and acetylcholine receptor." Lancet **335**(8690): 664-5.
- Bakker, A. B., Marissen, W. E., Kramer, R. A., Rice, A. B., Weldon, W. C., Niezgoda, M., Hanlon, C. A., Thijsse, S., Backus, H. H., de Kruif, J., Dietzschold, B., Rupprecht, C. E. und Goudsmit, J. (2005). "Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escape mutants." J Virol **79**(14): 9062-8.
- Baloul, L. und Lafon, M. (2003). "Apoptosis and rabies virus neuroinvasion." Biochimie **85**(8): 777-88.
- Barth, R. und Franke, V. (1996). Purified chick-embryo cell vaccine for humans. Laboratory techniques in rabies. F.-X. Meslin, M. M. Kaplan und H. Koprowski. Geneva, World Health Organization.
- Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A. und Lafay, F. (1991). "Antigenicity of rabies virus glycoprotein." J Virol **65**(8): 4198-203.

- Bhardwaj, M., Bhattacharya, D., Chhabra, M. und Ichhpujani, R. L. (2002). "Immunogenicity of purified chick embryo cell anti-rabies vaccine in post-exposure treatment of animal bite cases." J. Commun. Dis. **34**(1): 40-42.
- Blancou, J., Aubert, M. F., Cain, E., Selve, M., Thraenhart, O. und Bruckner, L. (1989). "Effect of strain differences on the potency testing of rabies vaccines in mice." J Biol Stand **17**(3): 259-66.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." Electrophoresis **8**: 93-99.
- Bourhy, H., Tordo, N., Lafon, M. und Sureau, P. (1989). "Complete cloning and molecular organization of a rabies-related virus, Mokola virus." J Gen Virol **70 ( Pt 8)**: 2063-74.
- Branche, R. (1996). Vaccine for humans prepared in human diploid cells. Laboratory techniques in rabies. F.-X. Meslin, M. M. Kaplan und H. Koprowski. Geneva, World Health Organization.
- Briggs, D. e. a. (2001). "Purified chick embryo cell culture rabies vaccine: interchangeability with human diploid cell culture rabies vaccine and comparison of one versus two-dose post-exposure booster regimen for previously immunized persons." Vaccine **19**: 1055-1060.
- Bruckner, L., Cussler, K., Halder, M., Barrat, J., Castle, P., Duchow, K., Greenwood, D. M., Gibert, R., Groen, J., Knapp, B., Levis, R., Milne, C., Parker, S., Stunkel, K., Visser, N. und Volkers, P. (2003). "Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop 48." Altern Lab Anim **31**(4): 429-54.
- CDC (1984). "Systemic allergic reactions following immunization with human diploid cell rabies vaccine." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **33**(14): 185-7.
- CDC (1999). "Human rabies prevention--United States, 1999. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)." MMWR Recomm Rep **48**(RR-1): 1-21.
- CDC (2003). Surveillance for Safety After Immunization: Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) - United States, 1991-2001. MMWR.
- CDC (2004). "Recovery of a patient from clinical rabies--Wisconsin, 2004." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **53**(50): 1171-3.
- Celis, E., Ou, D., Dietzschold, B. und Koprowski, H. (1988). "Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients." J Virol **62**(9): 3128-34.
- Charlton, K. M., Nadin-Davis, S., Casey, G. A. und Wandeler, A. I. (1997). "The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure." Acta Neuropathol (Berl) **94**(1): 73-7.

- Conti, C., Superti, F. und Tsiang, H. (1986). "Membrane carbohydrate requirement for rabies virus binding to chicken embryo related cells." Intervirology **26**(3): 164-8.
- Conzelmann, K. K., Cox, J. H., Schneider, L. G. und Thiel, H. J. (1990). "Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19." Virology **175**(2): 485-99.
- Coulon, P., Ternaux, J. P., Flamand, A. und Tuffereau, C. (1998). "An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro." J Virol **72**(1): 273-8.
- Dietzschold, B. (1996). Techniques for the purification of rabies virus, its subunits and recombinant products. Laboratory techniques in rabies. F.-X. Meslin, M. M. Kaplan und H. Koprowski. Geneva, World Health Organization.
- Dietzschold, B., Gore, M., Casali, P., Ueki, Y., Rupprecht, C. E., Notkins, A. L. und Koprowski, H. (1990). "Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus." J Virol **64**(6): 3087-90.
- Dietzschold, B., Lafon, M., Wang, H., Otvos, L. J., Celis, E., Wunner, W. H. und Koprowski, H. (1987). "Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins." Virus Res **8**(2): 103-25.
- Dietzschold, B., Rupprecht, C. E., Tollis, M., Lafon, M., Mattei, J., Wiktor, T. J. und Koprowski, H. (1988). "Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies." Rev Infect Dis **10 Suppl 4**: S785-98.
- Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Wunner, W. H. und Varrichio, A. (1983a). "Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein." Virology **124**(2): 330-7.
- Dietzschold, B., Wunner, W. H., Wiktor, T. J., Lopes, A. D., Lafon, M., Smith, C. L. und Koprowski, H. (1983b). "Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(1): 70-4.
- Dobardzic, A., Izurieta, H., Woo, E. J., Iskander, J., Shadomy, S., Rupprecht, C., Ball, R. und Braun, M. M. (2007). "Safety review of the purified chick embryo cell rabies vaccine: Data from the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), 1997-2005." Vaccine **25**(21): 4244-51.
- Dreesen, D. W. (1997). "A global review of rabies vaccines for human use." Vaccine **15 Suppl**: S2-6.
- Dreesen, D. W., Bernard, K. W., Parker, R. A., Deutsch, A. J. und Brown, J. (1986). "Immune complex-like disease in 23 persons following a booster dose of rabies human diploid cell vaccine." Vaccine **4**(1): 45-9.

- Dreesen, D. W., Fishbein, D. B., Kemp, D. T. und Brown, J. (1989). "Two-year comparative trial on the immunogenicity and adverse effects of purified chick embryo cell rabies vaccine for pre-exposure immunization." Vaccine 7(5): 397-400.
- Drings, A., Jallet, C., Chambert, B., Tordo, N. und Perrin, P. (1999). "Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine?" Vaccine 17(11-12): 1549-57.
- Edman, P. (1950). Acta Chem. Scand. 4: 283-293.
- Eriguchi, Y., Toriumi, H. und Kawai, A. (2002). "Studies on the Rabies Virus RNA Polymerase: 3. Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of the Multiplicity of Non-Catalytic Subunit (P Protein)." Microbiol. Immunol. 46(7): 463-474.
- Ertl, H. C., Dietzschold, B., Gore, M., Otvos, L. J., Larson, J. K., Wunner, W. H. und Koprowski, H. (1989). "Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein." J Virol 63(7): 2885-92.
- Esser, M. T., Marchese, R. D., Kierstead, L. S., Tussey, L. G., Wang, F., Chirmule, N. und Washabaugh, M. W. (2003). "Memory T cells and vaccines." Vaccine 21(5-6): 419-30.
- Etessami, R., Conzelmann, K. K., Fadai-Ghotbi, B., Natelson, B., Tsiang, H. und Ceccaldi, P. E. (2000). "Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an in vitro and in vivo study." J Gen Virol 81(Pt 9): 2147-53.
- Fekadu, M., Shaddock, J. H., Sanderlin, D. W. und Smith, J. S. (1988). "Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies and rabies-related viruses." Vaccine 6(6): 533-9.
- Fekadu, M., Sumner, J. W., Shaddock, J. H., Sanderlin, D. W. und Baer, G. M. (1992). "Sickness and recovery of dogs challenged with a street rabies virus after vaccination with a vaccinia virus recombinant expressing rabies virus N protein." J Virol 66(5): 2601-4.
- Felsenstein (1985). "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap." Evolution 39: 738-791.
- Ferguson, M., Wachmann, B., Needy, C. F. und Fitzgerald, E. A. (1987). "The effect of strain differences on the assay of rabies virus glycoprotein by single radial immunodiffusion." J Biol Stand 15(1): 73-7.
- Finke, S., Brzozka, K. und Conzelmann, K. K. (2004). "Tracking fluorescence-labeled rabies virus: enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P supports virus gene expression and formation of infectious particles." J Virol 78(22): 12333-43.

- Fischer, H. G., Bonifas, U. und Reichmann, G. (2000). "Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*." J Immunol **164**(9): 4826-34.
- Fu, Z. F. (1997). "Rabies and rabies research: past, present and future." Vaccine **15 Suppl**: S20-4.
- Fu, Z. F., Dietzschold, B., Schumacher, C. L., Wunner, W. H., Ertl, H. C. und Koprowski, H. (1991). "Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 2001-5.
- Fu, Z. F. und Jackson, A. C. (2005). "Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection." J Neurovirol **11**(1): 101-6.
- Galelli, A., Baloul, L. und Lafon, M. (2000). "Abortive rabies virus central nervous infection is controlled by T lymphocyte local recruitment and induction of apoptosis." J Neurovirol **6**(5): 359-72.
- Gamoh, K., Shimazaki, Y., Senda, M., Makie, H., Itoh, O., Muramatsu, M., Hirayama, N. und Hatakeyama, H. (2003). "Establishment of a potency test by ELISA for a rabies vaccine for animal use in Japan." J Vet Med Sci **65**(6): 685-8.
- Gaudin, Y. (1997). "Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones." J Virol **71**(5): 3742-50.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Knossow, M. und Flamand, A. (1993). "Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion." J Virol **67**(3): 1365-72.
- Georgitis, J. W. und Fasano, M. B. (2001). "Allergenic components of vaccines and avoidance of vaccination-related adverse events." Curr Allergy Rep **1**(1): 11-7.
- Gharahdaghi F., W. C., Meagher D., Imai B., Mische S. (1999). "Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity." Electrophoresis **20**: 601-605.
- Goto, H., Minamoto, N., Ito, H., Ito, N., Sugiyama, M., Kinjo, T. und Kawai, A. (2000). "Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus." J Gen Virol **81**(Pt 1): 119-27.
- Goto, H., Minamoto, N., Ito, H., Luo, T. R., Sugiyama, M., Kinjo, T. und Kawai, A. (1995). "Expression of the nucleoprotein of rabies virus in *Escherichia coli* and mapping of antigenic sites." Arch Virol **140**(6): 1061-74.
- Gould, A. R., Hyatt, A. D., Lunt, R., Kattenbelt, J. A., Hengstberger, S. und Blacksell, S. D. (1998). "Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia." Virus Res **54**(2): 165-87.
- Gupta, P. K., Sharma, S., Walunj, S. S., Chaturvedi, V. K., Raut, A. A., Patial, S., Rai, A., Pandey, K. D. und Saini, M. (2005). "Immunogenic and antigenic

- properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus." Vet Microbiol **108**(3-4): 207-14.
- Hamdan, M., Galvani, M. und Righetti, P. G. (2001). "Monitoring 2-D gel-induced modifications of proteins by MALDI-TOF mass spectrometry." Mass Spectrom Rev **20**(3): 121-41.
- Han, Z. und Harty, R. N. (2005). "Packaging of actin into Ebola virus VLPs." Virology **2**: 92.
- Hanna, J. N., Carney, I. K., Smith, G. A., Tannenberg, A. E., Deverill, J. E., Botha, J. A., Serafin, I. L., Harrower, B. J., Fitzpatrick, P. F. und Searle, J. W. (2000). "Australian bat lyssavirus infection: a second human case, with a long incubation period." Med J Aust **172**(12): 597-9.
- Hemachudha, T., Laothamatas, J. und Rupprecht, C. E. (2002). "Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges." Lancet Neurol **1**(2): 101-9.
- Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mittrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K. und Lewis, R. A. (2005). "Pathophysiology of human paralytic rabies." J Neurovirol **11**(1): 93-100.
- Hendriksen, C., Arciniega, J. L., Bruckner, L., Chevalier, M., Coppens, E., Descamps, J., Duchene, M., Dusek, D. M., Halder, M., Kreeftenberg, H., Maes, A., Redhead, K., Ravetkar, S. D., Spieser, J. M. und Swam, H. (2008). "The consistency approach for the quality control of vaccines." Biologicals **36**(1): 73-7.
- Hendriksen, C. F. (2006). "Towards eliminating the use of animals for regulatory required vaccine quality control." Altex **23**(3): 187-90.
- Herbert, B., Galvani, M., Hamdan, M., Olivieri, E., MacCarthy, J., Pedersen, S. und Righetti, P. G. (2001). "Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how?" Electrophoresis **22**(10): 2046-57.
- Hirai, K., Kawano, H., Mifune, K., Fujii, H., Nishizono, A., Shichijo, A. und Mannen, K. (1992). "Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus infection." Microbiol Immunol **36**(12): 1277-90.
- Hooper, D. C., Morimoto, K., Bette, M., Weihe, E., Koprowski, H. und Dietzschold, B. (1998). "Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system." J Virol **72**(5): 3711-9.
- Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D., Roberts, R. C. und van Oostrum, J. (2002). "Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients." Proteomics **2**(2): 127-34.
- Huckriede, A., Bungener, L., Stegmann, T., Daemen, T., Medema, J., Palache, A. M. und Wilschut, J. (2005). "The virosome concept for influenza vaccines." Vaccine **23 Suppl 1**: S26-38.

- Hvidberg, V., Maniecki, M. B., Jacobsen, C., Hojrup, P., Moller, H. J. und Moes-trup, S. K. (2005). "Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes." Blood **106**(7): 2572-9.
- Irie, T. und Kawai, A. (2002). "Studies on the different conditions for rabies virus neutralization by monoclonal antibodies #1-46-12 and #7-1-9." J Gen Virol **83**(Pt 12): 3045-53.
- Irie, T. und Kawai, A. (2005). "Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by a viral glycoprotein-specific monoclonal antibody, #1-46-12." Microbiol Immunol **49**(8): 721-31.
- Irie, T., Matsuda, Y., Honda, Y., Morimoto, K. und Kawai, A. (2002). "Studies on the escape mutants of rabies virus which are resistant to neutralization by a highly conserved conformational epitope-specific monoclonal antibody #1-46-12." Microbiol Immunol **46**(7): 449-61.
- Ishioka, N., Takahashi, N. und Putnam, F. W. (1986). "Amino acid sequence of human plasma alpha 1B-glycoprotein: homology to the immunoglobulin supergene family." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2363-7.
- Iverson, L. E. und Rose, J. K. (1981). "Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription." Cell **23**(2): 477-84.
- Iwasaki, Y., Liu, D. S., Yamamoto, T. und Konno, H. (1985). "On the replication and spread of rabies virus in the human central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **44**(2): 185-95.
- Iwasaki, Y. und Tobita, M. (2002). Pathology. Rabies. A. C. Jackson. San Diego, Academic Press.
- Iwata, M., Komori, S., Unno, T., Minamoto, N. und Ohashi, H. (1999). "Modification of membrane currents in mouse neuroblastoma cells following infection with rabies virus." Br J Pharmacol. **126**(8): 1691-8.
- Iwata, M., Unno, T., Minamoto, N., Ohashi, H. und Komori, S. (2000). "Rabies virus infection prevents the modulation by alpha(2)-adrenoceptors, but not muscarinic receptors, of Ca(2+) channels in NG108-15 cells." Eur J Pharmacol **404**(1-2): 79-88.
- Jackson, A. C. (2002a). Human Disease. Rabies. A. C. Jackson und W. H. Wunner. San Diego, Academic Press.
- Jackson, A. C. (2002b). Pathogenesis. Rabies. A. C. Jackson und W. H. Wunner. San Diego, Academic Press.
- Jackson, A. C. (2003). "Rabies virus infection: an update." J Neurovirol **9**(2): 253-8.
- Jackson, A. C. (2006). "Rabies: new insights into pathogenesis and treatment." Curr Opin Neurol **19**(3): 267-70.
- Jackson, A. C., Warrell, M. J., Rupprecht, C. E., Ertl, H. C., Dietzschold, B., O'Reilly, M., Leach, R. P., Fu, Z. F., Wunner, W. H., Bleck, T. P. und



- Wilde, H. (2003). "Management of rabies in humans." Clin Infect Dis **36**(1): 60-3.
- Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P. E. und Tordo, N. (2000). "Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein." J Virol **74**(21): 10217-22.
- Jarvis, D. L. (2003). "Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glykoprotein production." Virology **310**: 1-7.
- Jerkovic, L., Voegelé, A. F., Chwatal, S., Kronenberg, F., Radcliffe, C. M., Wormald, M. R., Lobentanz, E. M., Ezech, B., Eller, P., Dejori, N., Dieplinger, B., Lottspeich, F., Sattler, W., Uhr, M., Mechtler, K., Dwek, R. A., Rudd, P. M., Baier, G. und Dieplinger, H. (2005). "Afamin is a novel human vitamin E-binding glycoprotein characterization and in vitro expression." J Proteome Res **4**(3): 889-99.
- Johnson, N., Phillpotts, R. und Fooks, A. R. (2006). "Airborne transmission of lyssaviruses." J Med Microbiol **55**(Pt 6): 785-90.
- Kaaden, O. R. (2003). Virusinfektionen der Hunde. Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. B. Liess und O. R. Kaaden. Hannover, Schlütersche GmbH & Co. KG.
- Kankanamge, P. J., Irie, T., Shoji, J., Tochikura, T. S. und Kawai, A. (2003). "Further characterization of the rabies virus glycoproteins produced by virus-infected and G cDNA-transfected cells using a monoclonal antibody, #1-30-44, which recognizes an acid-sensitive epitope." Microbiol Immunol **47**(5): 337-49.
- Kärber, G. (1931). "Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche." Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **162**: 480.
- Karman, J., Ling, C., Sandor, M. und Fabry, Z. (2004). "Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens." Immunol Lett **92**(1-2): 107-15.
- Kimura, M. (1980). "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." J. Mol. Evol. **16**: 111-120.
- Klasse, P. J. und Sattentau, Q. J. (2002). "Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses." J Gen Virol **83**(Pt 9): 2091-108.
- Kristensson, K., Dastur, D. K., Manghani, D. K., Tsiang, H. und Bentivoglio, M. (1996). "Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies." Neuropathol Appl Neurobiol **22**(3): 179-87.
- Ladogana, A., Bouzamondo, E., Pocchiari, M. und Tsiang, H. (1994). "Modification of tritiated gamma-amino-n-butyric acid transport in rabies virus-infected primary cortical cultures." J Gen Virol **75** ( Pt 3): 623-7.

- Lafon, M., Bourhy, H. und Sureau, P. (1988). "Immunity against the European bat rabies (Duvenhage) virus induced by rabies vaccines: an experimental study in mice." Vaccine **6**(4): 362-8.
- Lafon, M., Ideler, J. und Wunner, W. H. (1984). "Investigation of the antigenic structure of rabies virus glycoprotein by monoclonal antibodies." Dev Biol Stand **57**: 219-25.
- Lafon, M. und Wiktor, T. J. (1985). "Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein." J Gen Virol **66 ( Pt 10)**: 2125-33.
- Lafon, M., Wiktor, T. J. und Macfarlan, R. I. (1983). "Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies." J Gen Virol **64 (Pt 4)**: 843-51.
- Langevin, C., Jaaro, H., Bressanelli, S., Fainzilber, M. und Tuffereau, C. (2002). "Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor." J Biol Chem **277**(40): 37655-62.
- Le Mercier, P., Jacob, Y. und Tordo, N. (1997). "The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase." J Gen Virol **78 ( Pt 7)**: 1571-6.
- Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J. und Tignor, G. H. (1982). "Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?" Science **215**: 182-4.
- Lewis, P., Fu, Y. und Lentz, T. L. (2000). "Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures." Muscle Nerve **23**(5): 720-30.
- Li, X. Q., Sarmiento, L. und Fu, Z. F. (2005). "Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated, rabies viruses." J Virol **79**(15): 10063-8.
- Lichenstein, H. S., Lyons, D. E., Wurfel, M. M., Johnson, D. A., McGinley, M. D., Leidli, J. C., Trollinger, D. B., Mayer, J. P., Wright, S. D. und Zukowski, M. M. (1994). "Afamin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family." J Biol Chem **269**(27): 18149-54.
- Liew, F. Y. (2002). "T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective." Nat Rev Immunol **2**(1): 55-60.
- Lodmell, D. L., Esposito, J. J. und Ewalt, L. C. (1993). "Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro." J Virol **67**(10): 6080-6.
- Lodmell, D. L., Smith, J. S., Esposito, J. J. und Ewalt, L. C. (1995). "Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants." J Virol **69**(8): 4957-62.
- Luo, T. R., Minamoto, N., Ito, H., Hiraga, S., Ito, N., Sugiyama, M. und Kinjo, T. (1997). "A virus-neutralizing epitope on the glycoprotein of rabies virus that contains Trp251 is a linear epitope." Virus Research **51**(1): 35-41.

- Lyles, D. S. und Rupprecht, C. E. (2007). Rhabdoviridae. Virology. B. N. Fields und D. M. Knipe. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Macfarlan, R. I., Dietzschold, B. und Koprowski, H. (1986). "Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain." Mol Immunol **23**(7): 733-41.
- Macfarlan, R. I., Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Kiel, M., Houghten, R., Lerner, R. A., Sutcliffe, J. G. und Koprowski, H. (1984). "T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides." J Immunol **133**(5): 2748-52.
- Madaan, A. und Maddox, D. E. (2003). "Vaccine allergy: diagnosis and management." Immunol Allergy Clin North Am **23**(4): 555-88.
- Madhusudana, S. N., Sanjay, T. V., Mahendra, B. J., Sudarshan, M. K., Narayana, D. H., Giri, A., Muhamuda, K., Ravi, V., Vakil, H. B. und Malerczyk, C. (2006). "Comparison of safety and immunogenicity of purified chick embryo cell rabies vaccine (PCECV) and purified vero cell rabies vaccine (PVRV) using the Thai Red Cross intradermal regimen at a dose of 0.1 ML." Hum Vaccin **2**(5): 200-4.
- Madhusudana, S. N., Sanjay, T. V., Mahendra, B. J. und Suja, M. S. (2004). "Simulated post-exposure rabies vaccination with purified chick embryo cell vaccine using a modified Thai Red Cross regimen." Int J Infect Dis **8**(3): 175-9.
- Mansfield, K. L., Johnson, N. und Fooks, A. R. (2004). "Identification of a conserved linear epitope at the N terminus of the rabies virus glycoprotein." Journal of General Virology **85**: 3279-3283.
- Marissen, W. E., Kramer, R. A., Rice, A., Weldon, W. C., Niezgoda, M., Faber, M., Slootstra, J. W., Meloen, R. H., Clijsters-van der Horst, M., Visser, T. J., Jongeneelen, M., Thijsse, S., Throsby, M., de Kruif, J., Rupprecht, C. E., Dietzschold, B., Goudsmit, J. und Bakker, A. B. (2005). "Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis." J Virol **79**(8): 4672-8.
- Matejtschuk, P., Dash, C. H. und Gascoigne, E. W. (2000). "Production of human albumin solution: a continually developing colloid." Br J Anaesth **85**(6): 887-95.
- Mebatsion, T. (2001). "Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein." J Virol **75**(23): 11496-502.
- Mebatsion, T., Weiland, F. und Conzelmann, K. K. (1999). "Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G." J Virol **73**(1): 242-50.
- Meslin, F.-X., Kaplan, M. M. und Koprowski, H. (1996). Laboratory techniques in rabies. Geneva, WHO.

- Minamoto, N., Tanaka, H., Hishida, M., Goto, H., Ito, H., Naruse, S., Yamamoto, K., Sugiyama, M., Kinjo, T., Mannen, K. und et al. (1994). "Linear and conformation-dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus." Microbiol Immunol **38**(6): 449-55.
- Mitrabhakdi, E., Shuangshoti, S., Wannakrairot, P., Lewis, R. A., Susuki, K., Laothamatas, J. und Hemachudha, T. (2005). "Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies." J Neurol Sci **238**(1-2): 3-10.
- Moore, D. A., Sischo, W. M., Hunter, A. und Miles, T. (2000). "Animal bite epidemiology and surveillance for rabies postexposure prophylaxis." J Am Vet Med Assoc **217**(2): 190-4.
- Moore, S. M., Ricke, T. A., Davis, R. D. und Briggs, D. J. (2005). "The influence of homologous vs. heterologous challenge virus strains on the serological test results of rabies virus neutralizing assays." Biologicals **33**(4): 269-76.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. und Coffman, R. L. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- Muranjan, M., Nussenzweig, V. und Tomlinson, S. (1998). "Characterization of the Human Serum Trypanosome Toxin, Haptoglobin-related Protein." Journal of Biological Chemistry **273**(7): 3884-3887.
- Nadin-Davis, S. A., Sheen, M., Abdel-Malik, M., Elmgren, L., Armstrong, J. und Wandeler, A. I. (2000). "A panel of monoclonal antibodies targeting the rabies virus phosphoprotein identifies a highly variable epitope of value for sensitive strain discrimination." J Clin Microbiol **38**(4): 1397-403.
- Nagarajan, T., Reddy, G. S., Mohana Subramanian, B., Rajalakshmi, S., Thiagarajan, D., Tordo, N., Jallet, C. und Srinivasan, V. A. (2006). "A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture." Biologicals **34**(1): 21-7.
- Naito, S. und Matsumoto, S. (1978). "Identification of cellular actin within the rabies virus." Virology **91**: 151-163.
- Nermut, M. V., Wallengren, K. und Pager, J. (1999). "Localization of actin in Moloney murine leukemia virus by immunoelectron microscopy." Virology **260**(1): 23-34.
- Nicholson, K. G., Farrow, P. R., Bijok, U. und Barth, R. (1987). "Pre-exposure studies with purified chick embryo cell culture rabies vaccine and human diploid cell vaccine: Serological and clinical responses in man." Vaccine **5**: 208-210.
- Niezgoda, M., Hanlon, C. A. und Rupprecht, C. E. (2002). Animal Rabies. Rabies. A. C. Jackson und W. H. Wunner. San Diego, Academic Press.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. und Luckow, V. A. (1994). Baculovirus Expression Vectors, a Laboratory Manual. Oxford, Oxford University Press, Inc.

- Offit, P. A. und Jew, R. K. (2003). "Addressing parents' concerns: do vaccines contain harmful preservatives, adjuvants, additives, or residuals?" Pediatrics **112**(6 Pt 1): 1394-7.
- OIE (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
- OIE (2006). "Terrestrial Animal Health Code."
- Ott, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Busch, L. K., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Chertova, E. N., Arthur, L. O. und Henderson, L. E. (1996). "Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions." J Virol **70**(11): 7734-43.
- Packer, N. H., Lawson, M. A., Jardine, D. R., Sanchez, J. C. und Gooley, A. A. (1998). "Analyzing glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis." Electrophoresis **19**(6): 981-8.
- Pashenkov, M., Huang, Y. M., Kostulas, V., Haglund, M., Soderstrom, M. und Link, H. (2001). "Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid." Brain **124**(Pt 3): 480-92.
- Pasteur, L. (1885). "Méthode pour prévenir la rage après morsure." C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. **101**: 765-774.
- Pathak, S. S., Oudenaren, A. v. und Savelkoul, H. F. J. (1997). Quantitation of immunoglobulin concentration by ELISA. Immunology Methods Manual. I. Academic Press. San Diego. **2**: 1056-1075.
- Pedemonte, E., Mancardi, G., Giunti, D., Corcione, A., Benvenuto, F., Pistoia, V. und Uccelli, A. (2006). "Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases." Pharmacol Ther **111**(3): 555-66.
- Perrin, P., Morgeaux, S. und Sureau, P. (1990). "In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody." Biologicals **18**(4): 321-30.
- Perrin, P., Thibodeau, L. und Sureau, P. (1985). "Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies." Vaccine **3**(3): 325-32.
- Perrin, P., Tino de Franco, M., Jallet, C., Fouque, F., Morgeaux, S., Tordo, N. und Colle, J. H. (1996). "The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses." Res Virol **147**(5): 289-99.
- Perry, L. L. und Lodmell, D. L. (1991). "Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine resistance to street rabies virus." J Virol **65**(7): 3429-34.
- Phares, T. W., Kean, R. B., Mikheeva, T. und Hooper, D. C. (2006). "Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system." J Immunol **176**(12): 7666-75.

- Piyasirisilp, S. und Hemachudha, T. (2002). "Neurological adverse events associated with vaccination." Curr Opin Neurol **15**(3): 333-8.
- Piza, A. T., Pieri, K. M., Lusa, G. M., Caporale, G. M., Terreran, M. T., Machado, L. A. und Zanetti, C. R. (2002). "Effect of the contents and form of rabies glycoprotein on the potency of rabies vaccination in cattle." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(2): 265-8.
- Pollard, T. D. und Earnshaw, W. D. (2002). Cell Biology, W.B. Saunders Company.
- Prehaud, C., Coulon, P., LaFay, F., Thiers, C. und Flamand, A. (1988). "Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence." J Virol **62**(1): 1-7.
- Prehaud, C., Harris, R. D., Fulop, V., Koh, C. L., Wong, J., Flamand, A. und Bishop, D. H. (1990). "Expression, characterization and purification of a phosphorylated rabies nucleoprotein synthesized in insect cells by baculovirus vectors." Virology **178**: 486-497.
- Prehaud, C., Takehara, K., Flamand, A. und Bishop, D. H. (1989). "Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors." Virology **173**(2): 390-9.
- Prem Kumar, A. A., Mani, K. R., Palaniappan, C., Bhau, L. N. und Swaminathan, K. (2005). "Purification, potency and immunogenicity analysis of Vero cell culture-derived rabies vaccine: a comparative study of single-step column chromatography and zonal centrifuge purification." Microbes Infect **7**(9-10): 1110-6.
- Prosniak, M., Faber, M., Hanlon, C. A., Rupprecht, C. E., Hooper, D. C. und Dietzschold, B. (2003a). "Development of a cocktail of recombinant-expressed human rabies virus-neutralizing monoclonal antibodies for postexposure prophylaxis of rabies." J Infect Dis **188**(1): 53-6.
- Prosniak, M., Hooper, D. C., Dietzschold, B. und Koprowski, H. (2001). "Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2758-63.
- Prosniak, M., Zborek, A., Scott, G., Roy, A., Phares, T., Koprowski, H. und Hooper, D. C. (2003b). "Differential expression of growth factors at the cellular level in virus-infected brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6765-6770.
- Raux, H., Coulon, P., Lafay, F. und Flamand, A. (1995). "Monoclonal antibodies which recognize the acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be neutralizing." Virology **210**(2): 400-8.
- Raux, H., Flamand, A. und Blondel, D. (2000). "Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain." J Virol **74**(21): 10212-6.
- Raux, H., Iseni, F., Lafay, F. und Blondel, D. (1997). "Mapping of monoclonal antibody epitopes of the rabies virus P protein." J Gen Virol **78** ( Pt 1): 119-24.

- Rooijackers, E. J., Uittenbogaard, J. P., Groen, J. und Osterhaus, A. D. (1996). "Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA systems for antigenicity testing." J Virol Methods **58**(1-2): 111-9.
- Sagara, J. und Kawai, A. (1992). "Identification of Heat Shock Protein 70 in the Rabies Virion." Virology **190**: 845-848.
- Sagara, J., Tsukita, S., Yonemura, S., Tsukita, S. und Kawai, A. (1995). "Cellular Actin-Binding Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Family Proteins Are Incorporated into the Rabies Virion and Closely Associated with Viral Envelope Proteins in the Cell." Virology **206**: 485-494.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-25.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**: 5463-5467.
- Sarmiento, L., Tsegai, T., Dhingra, V. und Fu, Z. F. (2006). "Rabies virus-induced apoptosis involves caspase-dependent and caspase-independent pathways." Virus Res **121**(2): 144-51.
- Schägger, H. und Jagow, G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal. Biochem. **166**: 368-379.
- Seder, R. A. und Hill, A. V. (2000). "Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity." Nature **406**(6797): 793-8.
- Sehgal, S., Bhattacharya, D. und Bhardwaj, M. (1995). "Ten year longitudinal study of efficacy and safety of purified chick embryo cell vaccine for pre- and post-exposure prophylaxis of rabies in Indian population." J Commun Dis **27**(1): 36-43.
- Seif, I., Coulon, P., Rollin, P. E. und Flamand, A. (1985). "Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein." J Virol **53**(3): 926-34.
- Shakin-Eshleman, S. H., Remaley, A. T., Eshleman, J. R., Wunner, W. H. und Spitalnik, S. L. (1992). "N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein. Individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression." J Biol Chem **267**(15): 10690-8.
- Shaw, M. M. und Riederer, B. M. (2003). "Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis." Proteomics **3**(8): 1408-17.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M. (1996). "Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels." Analytical Chemistry **68**(5): 850-858.
- Shrikant, P. und Benveniste, E. N. (1996). "The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation." J Immunol **157**(5): 1819-22.

- Smith, J. S., Fishbein, D. B., Rupprecht, C. E. und Clark, K. (1991). "Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation." N Engl J Med **324**(4): 205-11.
- Sokol, F., Schlumberger, H. D., Wiktor, T. J. und Koprowski, H. (1969). "Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus." Virology **38**(4): 651-65.
- Sriaroon, C., Sriaroon, P., Daviratanasilpa, S., Khawplod, P. und Wilde, H. (2006). "Retrospective: animal attacks and rabies exposures in Thai children." Travel Med Infect Dis **4**(5): 270-4.
- Srinivasan, A., Burton, E. C., Kuehnert, M. J., Rupprecht, C., Sutker, W. L., Ksiazek, T. G., Paddock, C. D., Guarner, J., Shieh, W. J., Goldsmith, C., Hanlon, C. A., Zoretic, J., Fischbach, B., Niezgod, M., El-Feky, W. H., Orciari, L., Sanchez, E. Q., Likos, A., Klintmalm, G. B., Cardo, D., LeDuc, J., Chamberland, M. E., Jernigan, D. B. und Zaki, S. R. (2005). "Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients." N Engl J Med **352**(11): 1103-11.
- Stephenson, I., Nicholson, K. G., Gluck, R., Mischler, R., Newman, R. W., Palache, A. M., Verlander, N. Q., Warburton, F., Wood, J. M. und Zambon, M. C. (2003). "Safety and antigenicity of whole virus and subunit influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) vaccine in healthy adults: phase I randomised trial." Lancet **362**(9400): 1959-66.
- Superti, F., Hauttecoeur, B., Morelec, M. J., Goldoni, P., Bizzini, B. und Tsiang, H. (1986). "Involvement of gangliosides in rabies virus infection." J Gen Virol **67** ( Pt 1): 47-56.
- Superti, F., Seganti, L., Tsiang, H. und Orsi, N. (1984). "Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. Brief report." Arch Virol **81**(3-4): 321-8.
- Swanson, M. C., Rosanoff, E., Gurwith, M., Deitch, M., Schnurrenberger, P. und Reed, C. E. (1987). "IgE and IgG antibodies to beta-propiolactone and human serum albumin associated with urticarial reactions to rabies vaccine." J. Infect. Dis. **155**(5): 909-913.
- Takahashi, N., Takahashi, Y. und Putnam, F. W. (1985). "Complete amino acid sequence of human hemopexin, the heme-binding protein of serum." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(1): 73-7.
- Takayama-Ito, M., Inoue, K., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I. und Morimoto, K. (2006). "A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein." Virus Res **119**(2): 208-15.
- Takita-Sonoda, Y., Fujii, H., Mifune, K., Ito, Y., Hiraga, M., Nishizono, A., Mannen, K. und Minamoto, N. (1993). "Resistance of mice vaccinated with rabies virus internal structural proteins to lethal infection." Arch Virol **132**(1-2): 51-65.



- Thoulouze, M. I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H. und Lafon, M. (1998). "The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus." J Virol **72**(9): 7181-90.
- Tordo, N. (1996). Characteristics and molecular biology of the rabies virus. Laboratory techniques in rabies. F.-X. Meslin, M. M. Kaplan und H. Kowprowski. Geneva, World Health Organization.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R. G., Fang, R.-X., Jackson, A. O., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R. B. und Walker, P. J. (2005). Rhabdoviridae. Virus Taxonomy. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger und L. A. Ball, Elsevier Academic Press.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. und Rougeon, F. (1986). "Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene?" Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3914-8.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. und Rougeon, F. (1988). "Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses." Virology **165**(2): 565-76.
- Toriumi, H., Eriguchi, Y., Takamatsu, F. und Kawai, A. (2004). "Further Studies on the Hyperphosphorylated Form (p40) of the Rabies Virus Nominal Phosphoprotein (P)." Microbiol. Immunol. **48**(11): 865-874.
- Trimarchi, C. V. und Smith, J. S. (2002). Diagnostic Evaluation. Rabies. A. C. Jackson. San Diego, Academic Press.
- Tseng, C. F., Lin, C. C., Huang, H. Y., Liu, H. C. und Mao, S. J. (2004). "Antioxidant role of human haptoglobin." Proteomics **4**(8): 2221-8.
- Tsiang, H., Ceccaldi, P. E. und Lycke, E. (1991). "Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons." J Gen Virol **72** (Pt 5): 1191-4.
- Tuffereau, C., Benejean, J., Roque Alfonso, A. M., Flamand, A. und Fishman, M. C. (1998). "Neuronal Cell Surface Molecules Mediate Specific Binding to Rabies Virus Glycoprotein Expressed by a Recombinant Baculovirus on the Surfaces of Lepidopteran Cells." Journal of Virology **72**(2): 1085-1091.
- Tuffereau, C., Leblois, H., Benejean, J., Coulon, P., Lafay, F. und Flamand, A. (1989). "Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice." Virology **172**(1): 206-12.
- Vodopija, I., Baklaic, Z. und Vodopija, R. (1999). "Rabipur: a reliable vaccine for rabies protection." Vaccine **17**(13-14): 1739-41.
- Wang, Z. W., Sarmiento, L., Wang, Y., Li, X. Q., Dhingra, V., Tsegge, T., Jiang, B. und Fu, Z. F. (2005). "Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system." J Virol **79**(19): 12554-65.
- Warrell, M. J. und Warrell, D. A. (2004). "Rabies and other lyssavirus diseases." Lancet **363**(9413): 959-69.

- Warrilow, D., Smith, I. L., Harrower, B. und Smith, G. A. (2002). "Sequence analysis of an isolate from a fatal human infection of Australian bat lyssavirus." Virology **297**(1): 109-19.
- Warrington, R. J., Martens, C. J., Rubin, M., Rutherford, W. J. und Aoki, F. Y. (1987). "Immunologic studies in subjects with a serum sickness-like illness after immunization with human diploid cell rabies vaccine." J. Allergy Clin. Immunol. **79**(4): 605-610.
- WHO (2001). Causality assessment of adverse events following immunization. Global Advisory Committee on Vaccine Safety.
- WHO (2002). "Weekly epidemiological record." **77**(14): 109-120.
- WHO (2003). "Rabies Vaccine, in: Immunization, Vaccines and Biologicals." World Health Organization.
- WHO (2004). Expert Consultation on Rabies. First report, World Health Organization.
- WHO (2005). Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs, in: Expert Committee on Biological Standardization, World Health Organization.
- Wicher, K. B. und Fries, E. (2004). "Prohaptoglobin is proteolytically cleaved in the endoplasmic reticulum by the complement C1r-like protein." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14390-5.
- Wiktor, T. J., Doherty, P. C. und Koprowski, H. (1977). "Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus." J Exp Med **145**(6): 1617-22.
- Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Reagan, K. J., Dietzschold, B., Curtis, P. J., Wunner, W. H., Kieny, M. P., Lathe, R., Lecocq, J. P., Mackett, M. und et al. (1984). "Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(22): 7194-8.
- Wilbur, L. A. und Aubert, M. F. A. (1996). The NIH test for potency. Laboratory techniques in rabies. F.-X. Meslin, M. M. Kaplan und H. Koprowski. Geneva, World Health Organization.
- Wilkinson, L. (2002). History. Rabies. A. Jackson und W. Wunner. San Diego, Elsevier Science.
- Winkler, W. G., Fashinell, T. R., Leffingwell, L., Howard, P. und Conomy, P. (1973). "Airborne rabies transmission in a laboratory worker." Jama **226**(10): 1219-21.
- Xiang, Z. Q., Knowles, B. B., McCarrick, J. W. und Ertl, H. C. (1995). "Immune effector mechanisms required for protection to rabies virus." Virology **214**(2): 398-404.
- Xiao, B. G. und Link, H. (1998). "Immune regulation within the central nervous system." J Neurol Sci **157**(1): 1-12.

- Yan, X., Mohankumar, P. S., Dietzschold, B., Schnell, M. J. und Fu, Z. F. (2002).  
"The rabies virus glycoprotein determines the distribution of different  
rabies virus strains in the brain." J Neurovirol 8(4): 345-52.

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Betreuung von Prof. Dr. H.-J. Thiel angefertigt. Diese Arbeit wurde durch die Firma Chiron Vaccines (Novartis Behring, Marburg) gefördert.

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Personen, die mir direkt oder indirekt wichtige Hinweise gegeben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Dissertation in seinem Institut anzufertigen. Vielen Dank für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Matthias König für seine uneingeschränkte Unterstützung, insbesondere bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Danke für deinen Rat, deine Hilfe und die fachliche Betreuung.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Dr. Iris Stallkamp für die Einführung in die molekularbiologischen Verfahren und die Bereitstellung der Sequenzen der kompletten Genome der Tollwutvirusstämme FluryLEP und PM 1503 sowie einiger rekombinanter Baculoviren.

Ich danke Gerry, Beate, Svenja und Elke für die freundliche Zusammenarbeit, insbesondere Beate für ihre Hilfe bei der Kultivierung von Insektenzellen. Ebenfalls einen ganz hertzlichen Dank an Iris, Svenja und Martina, die Shakira, Eva, Verona, Mona Lisa und Merlin ein neues Zuhause gegeben haben.

Ganz besonders danke ich Dr. Barbara Bank-Wolf für die Korrekturen dieser Arbeit. Ohne deine Hilfe hätte ich nicht so viel über Deklinationen in der Grammatik der deutschen Sprache gelernt... der, die, das, Nominativ, Akkusa-

tiv, Dativ oder Genitiv?? Babsi, für deine Geduld und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft herzlichen Dank!!

Bei Stefanie Deike bedanke ich mich sehr herzlich für die enthusiastische und freundliche Unterstützung und Einarbeitung in die Elektronenmikroskopie.

Ich möchte mich noch einmal recht herzlich bei euch beiden, Babsi und Steffi-lein, bedanken. Ihr habt mir ein "Ohr" und eine "Schulter" angeboten, wann immer ich sie brauchte.

Dank an meine Kolleginnen Tine, Deborah und Jessica, die mich - jede auf ihre Art - unterstützt haben. Auch dir, Jessica, vielen Dank für das Korrekturlesen.

Un super especial agradecimiento para Sibi y Gleyder, con quienes pude compartir muchos momentos enriquecedores, no solo de esparcimiento sino también a nivel profesional. Gracias por su entusiasmo, consejo y apoyo.

Herrn Dr. Goetz Reiner und Dr. Helmut Müller von Chiron Vaccines (Novartis Behring, Marburg) danke ich für die Bereitstellung von notwendigen Materialien für die Herstellung der analysierten Impfstoffe sowie Antikörper. Ebenso danke ich Dr. Klaus Conzelmann und Dr. Stefan Finke für die Bereitstellung von Antikörpern.

Ich danke Dr. Klaus Failing von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner ELISA-Daten.

Abschließend... quiero agradecer de todo corazón a mi esposo Thomas quien tuvo la paciencia para sobrellevar aquellas largas noches de trabajo y por su incondicional apoyo y capacidad de escucha. Así mismo a mi familia porque a pesar de la distancia siempre han estado al lado mío y me han apoyado en las decisiones que he tomado y que han marcado mi vida. Los amo a todos!!!

## **PRÄSENTATIONEN AUF KONGRESSEN**

Teile der vorgelegten Arbeit wurden in folgenden Kongressen als Poster präsentiert:

Alternatives to animal testing: new approaches in the development and control of biological. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM). Dubrovnik, Kroatien. April, 2008:

Claudia Carolina Lopez Yomayaza, Matthias König and Heinz-Jürgen Thiel;  
"Assessment of the integrity of virus particles in rabies vaccine preparations".

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN 3-8359-5435-0



©